

# **Wirkmechanismen CD20-gerichteter Antikörper vom IgA Isotyp**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von

Anna Kretschmer

Kiel 2017





Erste/r Gutacher/in: Prof. Dr. Axel. J. Scheidig

Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Valerius

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2018



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das Antigen CD20 als Ziel therapeutischer Antikörper .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Die Biologie des Antigens .....	4
1.2.2 Für die klinische Anwendung zugelassene Antikörper, die CD20 als Zielantigen adressieren .....	5
1.2.3 Bindung monoklonaler Antikörper an CD20 .....	5
<b>1.3 Wirkmechanismen therapeutischer CD20-gerichteter Antikörper .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Antikörperisotypen und deren Aufbau .....	7
1.3.2 IgG Antikörper in der Tumorthherapie.....	9
1.3.3 Typ I-CD20 Antikörper .....	9
1.3.4 Typ II- CD20 Antikörper .....	13
1.3.5 Fc/FcR Interaktionen CD20-gerichteter Antikörper .....	16
<b>1.4 Die Biologie humaner IgA Antikörper .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Der IgA spezifische Fc-Rezeptor FcαRI (CD89) .....</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Präklinische Entwicklung von IgA Antikörpern für die Tumorthherapie .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7 Strategien zur Optimierung von IgA-Molekülen für die Tumorthherapie .....</b>	<b>24</b>
<b>1.8 Eigene Vorarbeiten .....</b>	<b>27</b>
1.8.1 Aktivierung von PMN als Effektorzellen für ADCC durch einen CD20-IgA2 Antikörper .....	27
1.8.2 Aktivierung des Komplementsystems zur Tumorzelllyse durch IgA Antikörper .....	28
<b>1.9 Hypothesen &amp; Ziele .....</b>	<b>29</b>
<b>2. Material &amp; Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Ethikvotum und Einverständnis der Spender .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Konstruktion der Expressionsvektoren .....	31
2.2.2 Restriktionsverdau.....	32
2.2.3 Gelelektrophorese .....	33
2.2.4 Gelextraktion, Ligation und Transformation .....	33
2.2.5 Sequenzierung .....	34
2.2.6 Präparation endotoxinfreier DNA und deren photometrische Konzentrationsbestimmung .....	35
<b>2.3 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.3.1 Zellkultur.....	35
2.3.2 Produktion monoklonaler IgA Antikörper .....	37
2.3.2.1 Herstellung stabiler CHO-K1 Klone für die Antikörperproduktion .....	37
2.3.2.2 Transiente Antikörperproduktion in HEK FreeStyle™ 293-F Zellen .....	39
2.3.3 Durchflusszytometrie .....	39
2.3.3.1 Expression des Oberflächenantigens CD20 auf humanen Tumor- und transgenen Hamsterzelllinien .....	40

2.3.3.2 Nachweis der spezifischen Antigenbindung .....	40
2.3.3.3 Homotypische Aggregation .....	40
2.3.3.4 B-Zell-Depletion .....	41
2.3.3.5 Deposition der Komplementfaktoren C1q und C4b .....	42
2.3.4 Isolierung von Effektorzellen aus peripherem Blut .....	42
2.3.5 Präparation von humanem Serum .....	43
2.3.6 Chrom <sup>51</sup> -Freisetzungsversuche .....	43
<b>2.4 Biochemische Methoden .....</b>	<b>45</b>
2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Bestimmung von Antikörperkonzentrationen in Zellkulturüberständen .....	45
2.4.2 Affinitätschromatographie .....	46
2.4.3 Größenausschlußchromatographie .....	46
2.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung und Kapillargelelektrophorese .....	47
2.4.5 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	48
2.4.6 Western-Transfer Experimente .....	49
2.4.7 Grafische und statistische Auswertung der Daten .....	49
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Produktion und biochemische Charakterisierung CD20 gerichteter IgA Antikörper .....</b>	<b>50</b>
3.1.1 Generierung geeigneter Expressionsvektoren .....	50
3.1.2 Expression CD20 gerichteter IgA2.0 Antikörper in CHO K1 Zellen .....	51
3.1.3 Reinigung CD20 gerichteter IgA2.0 Antikörper aus Zellkulturüberständen .....	52
3.1.4 Qualitätskontrolle und Quantifizierung hergestellter CD20-IgA2.0 Antikörper .....	55
<b>3.2 Funktionelle Charakterisierung der generierten CD20 gerichteten IgA Antikörper .....</b>	<b>58</b>
3.2.1 CD20 Expression aller in der Arbeit verwendeten Zelllinien .....	59
3.2.2. Bindung der CD20 gerichteten IgA Antikörper an CD20 exprimierende CHO K1 Zellen .....	59
3.2.3 Homotypische Aggregation .....	61
3.2.4 B-Zell-Depletion .....	65
3.2.5 Bindung der CD20 gerichteten IgA Antikörper an FcαRI exprimierende BHK Zellen .....	68
3.2.6 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität .....	68
3.2.6.1 Unstimulierte PMN als Effektorzellen für IgA vermittelte ADCC .....	68
3.2.6.2 MNC als Effektorzellen für anti-CD20-IgG1 vermittelte ADCC .....	69
3.2.6.3 GM-CSF stimulierte PMN als Effektorzellen für IgA vermittelte ADCC .....	70
3.2.7 Komplementvermittelte Zytotoxizität .....	74
3.2.7.1 CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper vermittelte CDC gegen Tumorzelllinien .....	74
3.2.7.2 CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper vermittelte konzentrationsabhängige CDC .....	75
3.2.7.3 CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper vermittelte C1q-Bindung und C4b-Deposition auf SU-DHL4 Zellen .....	78
<b>3.3 tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>4.1 Produktion und Aufreinigung CD20 gerichteter IgA Antikörper .....</b>	<b>82</b>

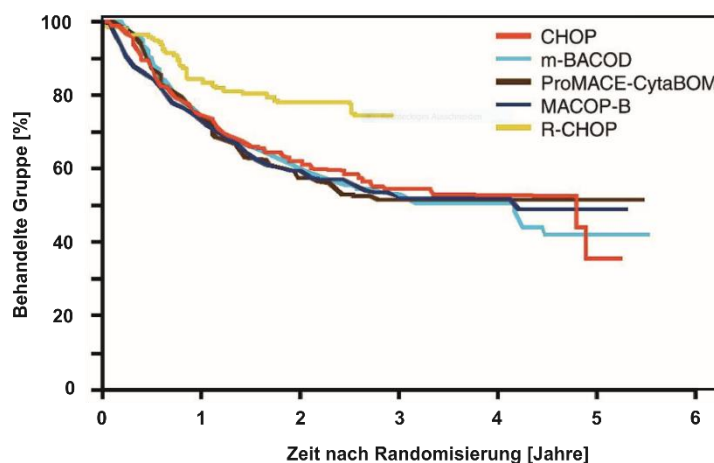
<b>4.2 Bindungsverhalten der generierten IgA Antikörper an CD20 .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3 Funktionelle Charakterisierung rekombinanter, CD20 gerichteter IgA Antikörper.....</b>	<b>85</b>
4.3.1 Die durch verschiedene CD20-gerichtete IgA und -IgG Antikörper induzierte B-Zelldepletion im Vergleich.....	85
4.3.2 Homotypische Aggregation und caspaseunabhängiger Zelltod vermittelt durch CD20-gerichtete IgA und -IgG Antikörper im Vergleich .....	87
4.3.3 Rekrutierung von PMN Effektorzellen für ADCC .....	89
4.3.4 Durch CD20-gerichtete IgA Antikörper induzierte CDC in CD20 <sup>pos</sup> Tumorzelllinien .....	91
<b>4.4 Typ I oder Typ II: Wie können die generierten IgA-Moleküle kategorisiert werden? .....</b>	<b>92</b>
<b>4.5 Zukünftige Vorhaben.....</b>	<b>93</b>
4.5.1 Mechanismen der von CD20-gerichteten IgA Antikörpern vermittelten CDC verstehen ....	93
4.5.2 Untersuchungen zur in vivo Aktivität der generierten Antikörper .....	94
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>97</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>111</b>
<b>9.1 Material.....</b>	<b>111</b>
9.1.1 Laborgeräte .....	111
9.1.2 Verbrauchsmaterialien (Glas und Plastik) .....	113
9.1.3 Chemikalien und Enzyme .....	115
9.1.4 Reagenzien & Kits .....	116
9.1.5 Vektoren .....	118
9.1.6 Allgemeine Puffer und Lösungen .....	119
9.1.7 Bakterienstämme .....	119
9.1.8 Antikörper.....	120
9.1.9 Software .....	121
<b>9.2 Inhibition der homotypischen Aggregation mit einem Pan-Caspase-Inhibitor.....</b>	<b>122</b>
<b>9.3 Beeinflussung der B-Zelldepletion durch den Einsatz von GM-CSF and Eculizumab.....</b>	<b>122</b>
<b>9.4 Korrelation der CD20 Expression und PMN vermittelter ADCC verschiedener CD20<sup>pos</sup> Zelllinien .....</b>	<b>123</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>124</b>
<b>11. Publikationen .....</b>	<b>129</b>
<b>12. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>130</b>
<b>13. Curriculum vitae .....</b>	<b>131</b>
<b>14. Danksagung.....</b>	<b>133</b>



## 1. Einleitung

### 1.1 Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie

Während zwischen der Beschreibung der Hybridom-Technologie im Jahr 1975 (Kohler & Milstein, 1975) und der Zulassung des ersten monoklonalen Antikörpers Muromonab-CD3 (Handelsname: Orthoclone OKT3®; Hersteller Janssen-Cilag) (Cosimi *et al*, 1981; Sgro, 1995) durch die Food and Drug Administration (engl., FDA) im Jahr 1986 noch 11 Jahre lagen, werden aktuell mehrere



**Abbildung 1: Der Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom, die sowohl mit R-CHOP als auch mit anderen Chemotherapieregimen behandelt wurden.** CHOP= Cyclophosphamid, Doxorubicin, Oncovin, und Prednison, MACOP-B = Methotrexat, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin, Prednison–Bleomycin; m-BACOD = Methotrexat-Bleomycin, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin, Dexamethason; ProMACE–Cyta BOM = Prednisone, Methotexat, Adriamycin, Cyclophosphamid, Etoposid/Cytarabin, Bleomycin, Oncovin, Methotrexat; Die Daten dieser Grafik entstammen mehrerer Studien, die zusammengefasst und in Dotan *et al*, 2010 in genau dieser graphischen Form veröffentlicht wurden.

therapeutische Antikörper jährlich für die Behandlung verschiedener Erkrankungen weltweit zugelassen. Frühe Antikörperformate trugen zumeist murine Sequenzmotive. Schnell zeigten sich in der Behandlung der Patienten mit solchen murinen Antikörpern allerdings sog. Anti-Antikörper Immunantworten (*anti-antibody-responses*, AAR), die den Therapieerfolg der Moleküle auch bei starker Immunsuppression deutlich einschränkten (Jaffers *et al*, 1986). Die Entwicklung hin zu chimären Antikörperformaten, die murine variable Regionen kombiniert mit humanen konstanten Ketten trugen (Morrison *et al*, 1984; Boulianne *et al*, 1984), konnten zwar das Auftreten von AAR nicht vollständig verhindern, die Nebenwirkungen aber deutlich reduzieren.

Als bekanntestes und erfolgreichstes Beispiel für einen in der Klinik zugelassenen, chimären Antikörper gilt Rituximab (RTX) (Handelsname: MabThera, Roche, EU; Rituxan, Biogen/Genentech, USA). Der gegen das *Cluster of Differentiation* 20 (CD20) gerichtete chimäre IgG1 Antikörper wurde 1997 von der FDA zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) zugelassen und gilt bis heute als „Goldstandard“ in der Therapie verschiedener B-Zellmalignitäten. Patienten, deren aggressive Non-Hodkin-Erkrankung bereits fortgeschrittene Stadien erreichte, wurden zunächst mit verschiedenen Chemotherapien der ersten Generation behandelt. Die Standardtherapie zu diesem

Zeitpunkt bestand aus einer Kombination vierer Chemotherapeutika (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, und Prednison, CHOP). Die Ansprechraten bis hin zur kompletten Remission der Erkrankung erreichten mit dieser Therapiestrategie jedoch nur 45-55% des Patientenkollektives (Coiffier *et al*, 1998; McLaughlin *et al*, 1998). Zur Verbesserung des *Outcome* der Patienten wurden anschließend Behandlungsregime mit bis zu acht verschiedenen Chemotherapeutika untersucht, die jedoch keine signifikanten Verbesserungen des Therapieerfolges zeigten (Coleman M, 1985). Erst die Kombination des Antikörpers Rituximab mit der klassischen Chemotherapie CHOP (ab dann R-CHOP) verbesserte sowohl das Gesamtüberleben als auch das progressionsfreie Überleben der untersuchten Patientengruppe in British Columbia signifikant (siehe Abbildung 1) (Sehn *et al*, 2005; Dotan *et al*, 2010).

Die Evolution und Weiterentwicklung therapeutischer Antikörper beschleunigten sich seit dem enormen Erfolg von Rituximab unentwegt und gehen über die Behandlung onkologischer Erkrankungen hinaus bis hin zur Therapie von Autoimmun- und Entzündungserkrankungen sowie Infektionskrankheiten. Bereits 1986 wurde die Humanisierung eines anti-Hapten Antikörpers beschrieben, indem dessen komplementaritätsbestimmende Regionen (engl.: *Complementarity-determining regions*, CDRs) in die Gerüstregion eines humanen Antikörpers umgesetzt wurde (Jones *et al*, 1986). Mittlerweile sind über 70 therapeutische Antikörper und sog. Fc-Fusionsproteine für die Behandlung verschiedenster Erkrankungen zugelassen, wobei letztere eine Verknüpfung des kristallisierbaren Fragmentes (engl.: *Fragment crystallizable*, Fc, auch Fc-Domäne) eines IgG Antikörpers mit bestimmten Proteinen darstellt. Während nur fünf von diesen Molekülen vollständig murine Sequenzen beinhalten, ist die überwiegende Anzahl entweder chimärisiert (neun Antikörper) oder humanisiert (26 Antikörper) (zusammengefasst in (Strohl, 2017)).

Der erste vollständig humane Antikörper, der für die Therapie einer onkologischen Erkrankung zugelassen wurde, war Panitumumab (Handelsname: Vectibix®, Amgen), ein IgG2κ-Antikörper der gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) gerichtet ist und zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Vollständig humane Antikörper können mittels Hybridomtechnik erhalten werden, indem transgene Mäuse immunisiert werden, die als Immunantwort keine murinen, dafür aber humane Antikörper produzieren (Green *et al*, 1994; Jakobovits *et al*, 1995; Brüggemann *et al*, 2015). Eine andere Möglichkeit der Herstellung humaner Antikörper stellt das Phagen-Display dar (Smith, 1985; Frenzel *et al*, 2016). Dabei werden Gene von Fab-Domänen oder *single chain fragment variable*-Domänen (scFv) an Gene des Bakteriophagen (M13 Phage) gekoppelt, die eine Präsentation der antigenbindenden Antikörperfragmente auf der Oberfläche des Phagen ermöglichen. Antikörperbanken (*antibody library*) bestehen aus einer Mischung von Phagen, die jeweils unterschiedliche Fab/scFv-Domänen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Antikörperbanken können von  $10^7$  bis zu  $10^{12}$  individuelle



Phagenpartikel beinhalten, die das Antikörperrepertoire des Menschen widerspiegeln. Aus dieser Anzahl unterschiedlicher Phagen werden anschließend erfolgversprechende Kandidaten anhand ihrer Affinität bspw. zum Antigen sortiert (*panning*). Die Gene solcher Fab oder scFv-Domänen werden aus dem Bakteriophagen isoliert, sequenziert und können bspw. durch Umklonierung in Expressionsplasmide zur Etablierung antikörperproduzierender Zelllinien genutzt werden (Frenzel *et al*, 2017). Von den über 70 für die Therapie diverser Erkrankungen zugelassenen Antikörpern sind 23 humanen Ursprungs. Der größte Anteil dieser humanen Antikörper stammt aus verschiedenen transgenen Mausstämmen (17 von 23) und nur sechs von ihnen wurden über Phage-Display Banken hergestellt (Strohl, 2017).

Auch der im Jahr 2011 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (englisch: *European Medicines Agency*, EMA) und FDA zugelassene gegen das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (engl.: *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*, CTLA4) gerichtete Antikörper Ipilimumab ist ein in transgenen Mäusen produzierter IgG1 Antikörper. Die Zulassung des ersten Immun-Checkpoint-Inhibitors veränderte die Behandlung onkologischer Erkrankungen grundlegend. Prinzipiell können Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie andere monoklonale Antikörper sowohl Fab- als auch Fc-vermittelte Effekte auslösen, um Tumorzellen zu eliminieren. Doch anders als bspw. der therapeutische CD20 Antikörper Rituximab entfalten sie ihre Wirkung durch das Ansteuern sog. Immun-Checkpoints, die es dem Tumor ermöglichen, einer Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem (T-Zellantwort) zu entgehen. Dabei können sowohl Tumorzellen als auch antigenpräsentierende Zellen spezifische Liganden exprimieren, die hemmende Rezeptoren auf T-Zellen binden. Unter dem Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren wird die Signalweiterleitung dieser hemmenden Liganden/Rezeptor-Achse blockiert, sodass das Immunsystem die Tumoren erkennen und beseitigen kann, die sich einer T-Zellantwort sonst entzogen hätten (Immun-Checkpoint-Inhibitoren zusammengefasst in: (Topalian *et al*, 2015; Sharma & Allison, 2015). Insgesamt sind mittlerweile sieben monoklonale Antikörper oder Fc-Fusionsproteine zugelassen, die verschiedene Immun-Checkpoints wie CTLA4, PD-1 oder PD-L1 adressieren (Strohl, 2017) und zu einer signifikanten Verbesserung der Therapieoptionen besonders schwer zu behandelnder Tumorerkrankungen wie dem metastasierten malignen Melanom geführt haben (zusammengefasst in: Sharma *et al*, 2017). Während das Auftreten von Nebenwirkungen durch die systemische Aktivierung von T-Zellen durch die Gabe Immun-Checkpoint-Inhibitoren mittlerweile gut behandelt werden kann (Larkin J *et al*, 2015), ist das Auftreten von Rezidiven unter der immuntherapeutischen Behandlungen bei mindestens einem Viertel des Patientenkollektivs zu erwarten (Schachter *et al*, 2017; Sharma *et al*, 2017). Die jüngste Entwicklung im Bereich der Immun-Checkpoint-Inhibitoren ist die Kombination mehrerer Antikörper, die verschiedene Immun-Checkpoints adressieren (zusammengefasst in: Kyi & Postow, 2016) oder auch die Kombination von Immun-Checkpoint-Blockade mit anderen

immunmodulatorischen Therapien wie bspw. sog. onkolytischen Viren wie Talimogen laherparepvec zur Behandlung des malignen Melanoms (ClinicalTrials.gov Identifizierungsnummer: NCT02263508, zusammengefasst in: Hamid *et al*, 2017). Ziel solcher Therapien ist dabei immer das Erreichen einer höchstmöglichen Antitumoraktivität bei möglichst minimalen Nebenwirkungen der eingesetzten Kombinationen.

## 1.2 Das Antigen CD20 als Ziel therapeutischer Antikörper

### 1.2.1 Die Biologie des Antigens

1980 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Stashenko *et al.* die erste wissenschaftliche Arbeit zu einem Antigen, genannt B1, das ausschließlich auf Lymphozyten der B-Zell-Reihe zu finden war. Bis zu diesem Zeitpunkt war die klare Unterscheidung von B-Zellen zu anderen Zellen der lymphatischen Reihe als auch zu Monozyten nur schwer vorzunehmen (Stashenko *et al*, 1980). Nachdem 1988 das Gen für B1 vollständig kloniert werden konnte, wurden basierend auf der Sequenz der komplementären DNA (engl.: complementary DNA, cDNA) Aussagen zur Proteinstruktur anhand von Hydrophobizitätsstudien des Antigens CD20 (früher B1) getroffen (Tedder *et al*, 1988). Das 33-37 kDa große, unglykosylierte Phosphoprotein CD20 durchspannt die B-Zell-Membran mit insgesamt vier hydrophoben transmembranären Domänen. Während Carboxy- und Aminoterminus im Zellinneren liegen, befindet sich ein ca. 44 Aminosäuren langer *loop* sowie ein nur aus 7 Aminosäuren bestehender kleiner *loop* außerhalb der Zelle (siehe Abbildung 2, zusammengefasst in Tedder & Engel, 1994; Polyak *et al*, 1998). Während der Entwicklung von B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen wird CD20 als Oberflächenmolekül auf verschiedenen Stadien in unterschiedlicher Ausprägung exprimiert. CD20-Expression lässt sich auf frühen Prä-B-Zellen über die gesamte B-Zell-Entwicklung bis hin zu späten Stadien der B-Gedächtniszellen nachweisen. Auf Plasmazellen und Pro-B-Zellen ist CD20 als Marker nicht nachweisbar. Neben der Expression von CD20 auf B-Zellen wird auch eine Expression des Antigens auf T-Zellen diskutiert. In der Vergangenheit wurden Daten zur CD20 Expression auf T-Zellen kritisch diskutiert und zum Teil auf Artefakte der durchflusszytometrischen Messungen zurückgeführt. In einer Publikation aus dem Jahr 2016 zeigte eine Arbeitsgruppe die CD20 Expression CD3-positiver T-Zellpopulationen aus dem Blut, Thymus, Knochenmark und anderen sekundären lymphatischen Organen (Schuh *et al*, 2016).

Verschiedene Studien zeigten indirekt, dass einzelne CD20-Moleküle als Multimere (Tetramere) in der B-Zellmembran vorliegen (Polyak & Deans, 2002). Noch immer ist kein spezifischer Ligand für CD20 bekannt und auch wenn die biologische Funktion des Moleküls weiterhin ungeklärt ist, gibt es einige Hinweise, welche Rolle CD20 in der Biologie der B-Zelle spielen könnte. CD20 liegt in der Plasmamembran als Oligomer vor und könnte direkt oder indirekt an der Bildung eines Kalziumkanals

beteiligt sein (Bubien *et al*, 1993). Des Weiteren scheint CD20 die räumliche Nähe zu weiteren Proteinen der B-Zellmembran (wie z.B. CD40, humanes Leukozytenantigen (HLA) -Klasse-II und dem B-Zellrezeptor, engl.: B-cell receptor, BCR) zu teilen, die ihrerseits wichtige Positionen in der Immunantwort durch Signaltransduktion und in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten haben (Léveillé *et al*, 1999) oder, in Bezug auf den BCR, Übergänge des Zellzyklus steuern (Petrie & Deans, 2002).

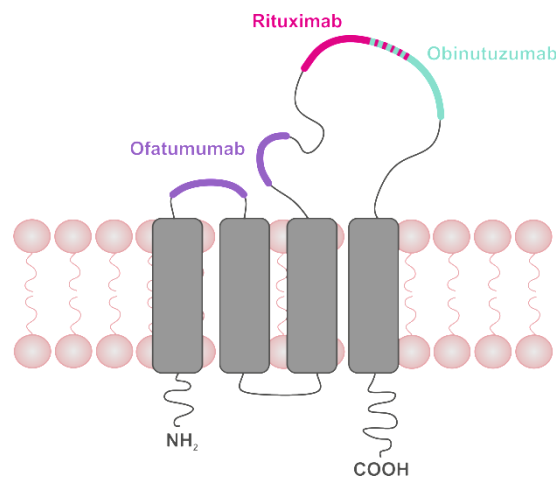
### 1.2.2 Für die klinische Anwendung zugelassene Antikörper, die CD20 als Zielantigen adressieren

Neben dem chimären Antikörper Rituximab sind auch noch zwei weitere Antikörper für die klinische Anwendung zugelassen, die gegen das B-Zell-Antigen CD20 gerichtet sind. Im Jahr 2010 erhielt zunächst der humane IgG1 Antikörper Ofatumumab (Ofa) (Handelsname: Arzerra, Genmab) eine Zulassung der EMA. Weitere drei Jahre später folgte dann der humanisierte und glykooptimierte IgG1 Antikörper Obinutuzumab (Obi) (Handelsname: Gazyva®, Roche), der von der FDA zunächst ebenfalls zur Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie zugelassen wurde. Neben den drei zugelassenen CD20-gerichteten, unkonjugierten IgG1 Antikörpern wurden in den Jahren 2002 und 2003 zusätzlich zwei Immunkonjugate zugelassen, die gegen das gleiche Antigen gerichtet sind. Sowohl bei Ibritumomab tiuxetan (Handelsname: Zevalin, Biogen Idec, Bayer Schering) als auch bei Tositumumab-I131 (Handelsname: Bexxar, GlaxoSmithKline) handelt es sich um radioaktiv-gekoppelte murine Antikörperformate, die ebenfalls bei der Behandlung von NHL eingesetzt wurden. Trotz guter Wirksamkeit und hoher Overall-Response-Rates (engl., ORR) behandelter Patienten, die die überlegene Effektivität beider Radioimmunkonjugate belegen konnten, wurden die Therapeutika unverhältnismäßig wenig im klinischen Alltag eingesetzt (zusammengefasst in Green & Press, 2017). Als Folge der geringen Anwendung und anderer organisatorischer, aber auch finanzieller Beweggründe stellte die Firma GlaxoSmithKline die Herstellung und den Verkauf von Tositumumab-I131 schließlich im Jahr 2014 ein (GlaxoSmithKline plc, 2013).

### 1.2.3 Bindung monoklonaler Antikörper an CD20

Bis zur Entwicklung des CD20-gerichteten Antikörpers Ofatumumab waren zwei Aminosäurereste an den Positionen 170 (Alanin) und 172 (Prolin) des großen extrazellulären *loops* des CD20 Antigens für die Bindung monoklonaler Antikörper ausschlaggebend. In Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass eingeführte Veränderungen dieser Aminosäuren das Binden sämtlicher getesteter CD20-gerichteter Antikörper unmöglich machte (Polyak & Deans, 2002). Im Jahr 2003 postulierte eine Arbeitsgruppe aufgrund ihrer gezeigten Daten, dass CD20-gerichtete Antikörper anhand ihrer Bindungseigenschaften an das Zielantigen in unterschiedliche Typen eingeteilt werden können. So

erkennen Typ I-Antikörper im Vergleich zu Typ II Antikörpern das Antigen auf der Zelloberfläche in einer 2:1 Stöchiometrie (Chan *et al*, 2003). Der Typ I-Antikörper Rituximab bspw. erkennt zwar ein überlappendes Epitop mit dem Typ-II Antikörper Obinutuzumab, doch die Bindung des einen oder des anderen Antikörpers wird dabei von unterschiedlichen Aminosäureresten definiert, die sich in demselben Epitop befinden (Abbildung 2). Die Orientierung der beiden Antikörper bei der Antigenbindung unterscheidet sich signifikant und könnte im Fall von Obinutuzumab auch zu sterischen Interferenzen mit CD20 führen (Niederfellner *et al*, 2011). Des Weiteren erstellten die Autoren die Hypothese, dass die verschiedenen Antikörper aufgrund ihrer Orientierung bei der Antigenbindung nur bestimmte Subgruppen von CD20 binden können. Diese Subtypen lassen sich aufgrund ihrer Konformation (offen oder geschlossen) definierten Bereichen der B-Zellmembran zuordnen. So könnte Rituximab bspw. CD20 Oligomere in fluiden, beweglichen Bereichen der Membran erkennen, während Obinutuzumab die CD20-Moleküle bindet, die eher statisch, an



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Antigens CD20 in der B-Zellmembran sowie die von den CD20-IgG1 Antikörpern adressierten Epitope.** CD20 durchspannt die B-Zellmembran mit insgesamt vier hydrophoben transmembranären Domänen. Während Carboxy- und Aminoterminus im Zellinneren liegen, befindet sich ein aus sieben Aminosäuren bestehender kleiner *loop* sowie ein ca. 44 Aminosäuren großer *loop* außerhalb der Zelle. Die CD20-gerichteten Antikörper Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab binden verschiedene Epitope des Antigens, wobei Rituximab und Obinutuzumab ein überlappendes Epitop auf dem großen *loop* erkennen.

Zell/Zellkontaktflächen auftreten. Die Bindung der Antikörper an den einen oder die anderen Subtyp stabilisiert schließlich diesen Membranbereich in seiner Konformation (Niederfellner *et al*, 2011). Andere Wissenschaftler betonen, dass auch sterische Eigenschaften der Antikörper die Anordnung der CD20-Oligomere in der Membran und damit auch die von den Antikörpern induzierten Effekte beeinflussen können (Cragg, 2011). Die Beeinflussung der Architektur des Zellmembranproteins CD20 durch die Behandlung mit CD20-gerichteten Antikörpern ist unumstritten.

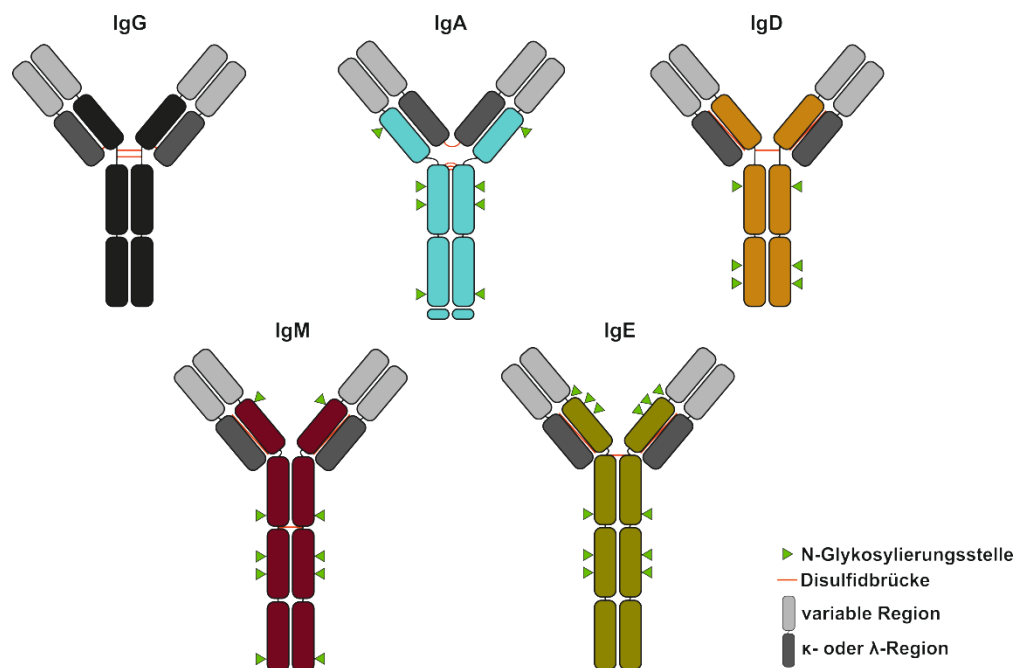
### 1.3 Wirkmechanismen therapeutischer CD20-gerichteter Antikörper

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den funktionellen Eigenschaften therapeutischer Antikörper. Antikörper, die zur Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt werden, können

eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte erzielen. Diese funktionellen Eigenschaften sind auch immer eng mit der biochemischen Struktur solcher Moleküle verknüpft, weshalb auch diese Gegenstand des nächsten Kapitels sein werden.

### 1.3.1 Antikörperisotypen und deren Aufbau

Antikörper werden von B-Zellen sezerniert und sind Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Durch ihre Variabilität können durch sie eine Vielzahl pathogener Antigene erkannt, gebunden und mithilfe von Effektorzellen oder -molekülen gebundene Erreger eliminiert werden. Das menschliche

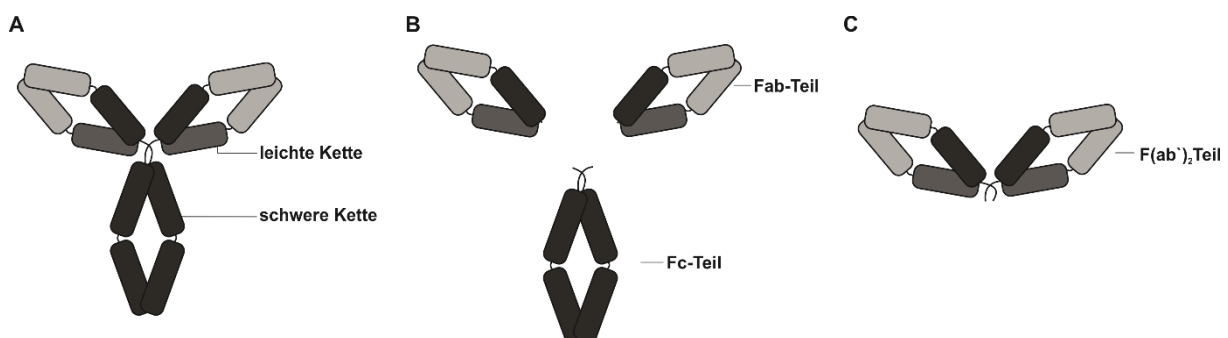


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der fünf humanen Antikörperisotypen.** In hellgrau sind variable Regionen sowohl der leichten als auch der schweren Kette dargestellt. Konstante Regionen der leichten Ketten (κ- oder λ-Kette) sind in dunkelgrau gezeigt. Die verschiedenen Isotypen tragen unterschiedlich viele N-Glykosylierungsstellen (Dreiecke in grün) außerdem können je nach Antikörper schwere und leichte Ketten über verschieden verknüpfte Disulfidbrücken miteinander verbunden sein. Während die schweren Ketten von IgG, IgA und IgD Antikörper drei Domänen (CH1-CH3) tragen, setzen sich die schweren Ketten von IgM und IgE aus insgesamt vier (CH1-CH4) Domänen zusammen (Domänen der schweren Ketten sind farbig hinterlegt).

Immunsystem verfügt über fünf verschiedene Antikörperformen, genannt Isotypen. Obwohl sich die verschiedenen Isotypen, IgG, IgM, IgD, IgA und IgE in einigen Charakteristika stark voneinander unterscheiden (Molekulare Masse, Ausbildung ihrer Disulfidbrücken, Anzahl und Art ihrer schweren Kette), kann ein allgemeingültiger Aufbau eines Antikörpers beschrieben werden (Abbildung 3). Über die variable Region binden Antikörper an ihr Antigen. Die konstante Region ist für die Vermittlung der verschiedenen Effektorfunktionen des Moleküls zuständig. Während die schweren Ketten von IgG, IgA und IgD Antikörper drei Domänen (CH1-CH3) tragen, setzen sich die schweren Ketten von IgM und IgE aus insgesamt vier (CH1-CH4) Domänen zusammen (siehe auch Abbildung 3). Jeder Antikörper besteht aus je zwei schweren und zwei leichten Ketten, die sowohl über nicht-kovalente

Wechselwirkungen als auch über kovalente Disulfidbrückenbindungen miteinander verknüpft sind. Jeder Antikörperisotyp zeigt außerdem ein unterschiedliches Muster an Sequenzmotiven, die die Position posttranslationaler Modifikationen wie N- oder O-Glykostrukturen festlegen.

Das *Fragment antigen binding* (engl., Fab, antigenbindendes Fragment) sowie die Fc-Domäne bilden nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Untereinheiten von Antikörpern. So setzt sich das durch Papainverdau erhaltene Fab typischerweise aus der vollständigen leichten Kette (variable Domäne und  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Kette) und der Fd-Domäne (variable Domäne sowie der CH1-Region der schweren Kette) zusammen und vermittelt, wie der Name schon sagt, die Antigenbindung (Abbildung 4B). Das Fc-Fragment seinerseits vermittelt die Effektorfunktionen, z.B. über die Bindung an Fc-Rezeptoren (FcR) auf Effektorzellen, die je nach Isotyp unterschiedlich sein können. Fab und Fc-Teil sind über eine je nach Isotyp unterschiedlich lange und flexible Gelenkregion (engl. *Hinge region*) miteinander verbunden. Eine weitere wichtige strukturelle Einheit ist das sog.  $F(ab)_2$ , das entsteht, nachdem ein Antikörper mit Pepsin verdaut wird. Die Spaltstelle des Enzyms liegt dabei in der Gelenkregion hinter einer Disulfidbrücke, die beide Fab-Teile miteinander verbindet (Abbildung 4C). Da  $F(ab)_2$  Domänen keinen Fc-Teil besitzen, finden sie breite Anwendung in der medizinischen Diagnostik und werden zusammen mit Fab für die Erstellung verschiedenster bipezifischer



**Abbildung 4: Antikörper setzen sich aus einer schweren und einer leichten Kette zusammen.** Zusätzlich können Antikörperfragmente benannt werden, die sich in Struktur und Funktion voneinander unterscheiden. Dabei vermittelt das *Fragment antigen binding* (engl., Fab, antigenbindendes Fragment) die spezifische Bindung des Antikörpers an sein Antigen, während das *Fragment crystallizable* (engl., Fc, auch Fc-Teil) bspw. an Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen binden kann. Sind beide Fab-Teil eines Antikörpers über einen Teil ihrer Gelenkregion miteinander verknüpft, spricht man von einem sog.  $F(ab')_2$ .

Antikörperformate verwendet. Design und Struktur solcher Formate reichen von IgG-ähnlichen Molekülen über die Kombination zweier variabler Regionen verschiedener Antikörper bis hin zu komplexen, aus mehreren einzelkettigen, variablen Domänen zusammengesetzten Fragmenten, die bspw. mit CH1-Domänen verknüpft sind und sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch konzipiert werden können. Je nach Fragestellung und Anforderung an das Antikörpermolekül können verschiedene Einzelteile wie aus einem Baukasten zu unterschiedlichen Formaten zusammengesetzt und getestet werden (zusammengefasst in: Brinkmann & Kontermann, 2017).

### 1.3.2 IgG Antikörper in der Tumorthherapie

Mit der Zulassung des CD20 gerichteten IgG1 Antikörpers Rituximab vor 20 Jahren begann die Ära der monoklonalen Antikörper für die Tumorthherapie. Den Grundstein des Erfolges für therapeutische IgG1 Antikörper legte eine Veröffentlichung der Forschungsgruppe um Brüggemann *et al.*, in der IgG1 im Vergleich zu anderen IgG-Subklassen und Antikörperisotypen besonders effektiv, sowohl CDC als auch ADCC gegen Zielzellen vermitteln konnte (Brüggemann *et al.*, 1987). Bis heute ist die überwiegende Mehrheit aller zugelassener monoklonaler Antikörper vom IgG1 Isotyp (Strohl, 2017). Prinzipiell können therapeutische Antikörper verschiedene Wirkmechanismen aktivieren. Dabei wird zwischen Fab- und Fc-vermittelten Wirkmechanismen unterschieden.

Über die Bindung des Antikörpers mit seinem Fab-Teil an sein Antigen kann bspw. die Liganden-Rezeptor-Interaktion blockiert und damit können Proliferation, Wachstumsarrest, Zelltod oder eine veränderte Signalweiterleitung der Zielzelle induziert werden. Zu den indirekten Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper zählen all jene Mechanismen, die über den Fc-Teil des Antikörpers vermittelt werden. Dazu zählen bspw. die Fixierung von Komplementfaktoren, die zur komplementabhängigen Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*, engl. CDC) der Zielzellen führt, sowie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, engl., ADCC), die über Antikörper-FcR-Interaktionen vermittelt werden. Sollen in der klinischen Anwendung bevorzugt Effektorzellen aktiviert oder CDC vermittelt werden, sind Antikörper mit einem IgG1-Rückgrat die bevorzugte Wahl (z.b.: Rituximab, Maloney *et al.*, 1997), Trastuzumab (Clynes *et al.*, 2000) oder Cetuximab (Hara *et al.*, 2008)). Stehen andererseits direkt-vermittelte Effekte wie die Neutralisierung von Antigenen (siehe Infliximab, Siddiqui & Scott, 2005)) oder die Beeinflussung von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen (siehe Panitumumab, Peeters *et al.*, 2008) im Vordergrund des therapeutischen Wirkens, wurden in der Vergangenheit auch Antikörper aus den IgG-Subklassen 2 und -4 zugelassen. Die für die Behandlung CD20-positiver Malignitäten zugelassenen unkonjugierten, monoklonalen Antikörper sind alle vom IgG1-Isotyp und werden aufgrund ihrer Bindung an CD20 und ihrer Wirkmechanismen in Typ I- oder Typ II-Antikörper unterteilt.

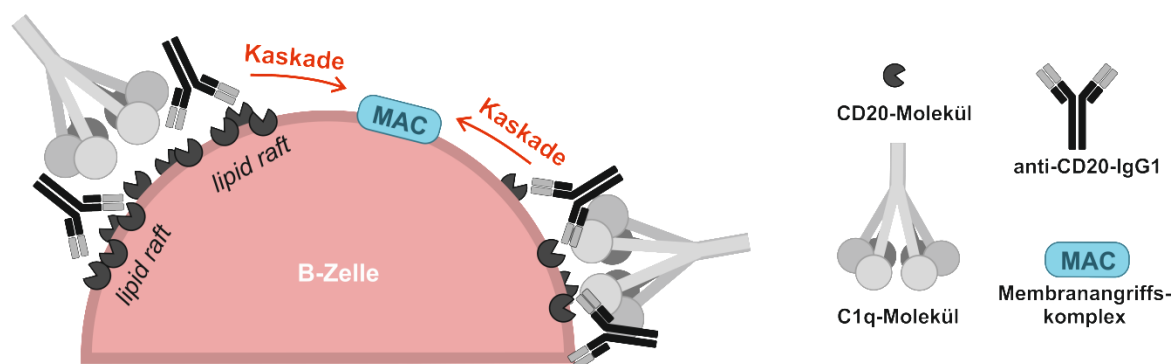
### 1.3.3 Typ I-CD20 Antikörper

Das B-Zellantigen CD20 bietet monoklonalen Antikörper mit insgesamt rund 50 Aminosäuren einen relativ kleinen Bereich zur Bindung an. Trotz der geringen Größe des CD20 Epitopes zeigten sich bereits in frühen Studien funktionelle Unterschiede verschiedener CD20-gerichteter Antikörper. So konnte die Forschergruppe um Josée Thérèse Golay bereits 1985 zeigen, dass die Antikörper 1F5, aber auch B1, sowohl B-Zelldifferenzierung und Immunglobulinproduktion stark hemmten. Doch neben der starken inhibitorischen Fähigkeiten zeigte 1F5 im Gegensatz zu B1 auch einen Einfluss auf

den Zellzyklus tonsillärer B-Zellen, indem der Antikörper den Übergang der Zellen von G0 zu G1 veranlasste, was letztendlich zu einer Vergrößerung der Zellen sowie der Vermehrung ihrer Ribonukleinsäuren (engl.: *ribonucleic acid*, RNA) führte. Die Autoren schlussfolgerten, dass aufgrund der Bindung der beiden CD20-gerichteten Antikörper an unterschiedliche Epitope des Antigens unterschiedliche Effekte zu erwarten waren, da sich 1F5 und B1 nur in ihren variablen Regionen unterschieden (beide trugen ein murines IgG2a Rückgrat, Golay *et al*, 1985).

Die Unterteilung CD20-gerichteter Antikörper in sog. Type I oder Type II Antikörper fand jedoch nicht nur anhand der unterschiedlich erkannten Epitope des Antigens CD20 statt an die sie banden. Es fanden sich Hinweise, dass Typ I- und Typ II Antikörper zwar dieselben Bereiche des Antigens CD20 erkennen, dieses jedoch in unterschiedlicher Art und Weise tun (Niederfellner *et al*, 2011). Das wichtigste Kriterium zur Unterscheidung zwischen Typ I- und Typ II Antikörpern wurde jedoch anhand funktioneller Effekte vorgenommen, die von den Antikörpern in den Zielzellen induziert wurden. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2004 konnten die Wissenschaftler Mark S. Cragg and Martin J. Glennie zum ersten Mal zeigen, dass die monoklonalen Antikörper RTX und 1F5 anders als der Antikörper B1 *in vivo* Tumorzellen in einem xenogenen Lymphom-Mausmodell in Abhängigkeit des Komplementsystems eliminierten (Cragg & Glennie, 2004).

Während durch Bindung eines Typ I-Antikörpers an CD20 typischerweise eine Umorientierung des Antigens in der Plasmamembran in sog. *lipid rafts* stattfindet, vermitteln Typ-II-Antikörper die Reorganisation verschiedener Membranproteine nicht. *Lipid rafts* werden als Triton X-100-unlöslich definiert (Deans *et al*, 1998) und die Gruppierung von CD20 in der Plasmamembran der B-Zelle steht



**Abbildung 5: Der Mechanismus der klassischen Komplementaktivierung ist von dessen Initiationsmolekül C1q abhängig.** Antikörperbindung an CD20<sup>pos</sup> Zellen vermittelt die Interaktion zwischen Antikörper-Fc und C1q. C1q und dessen gebundene Serinproteasen lösen eine Kaskade von Spaltreaktionen aus, in deren Konsequenz die Etablierung des Membranangriffskomplexes zur Zytolyse der Zelle führt. Durch die Antikörperbindung kommt es zu einer Umstrukturierung der CD20-Antigene in der Zellmembran in sog. *lipid rafts*.

im engen Zusammenhang zur Fähigkeit der Antikörper C1q als erstes Molekül der Komplementkaskade anzulagern und CDC über den klassischen Komplementweg zu vermitteln (siehe Abbildung 5) (Cragg *et al*, 2003). Die Quervernetzung zweier oder mehrerer Antikörper spielte in der Umverteilung der CD20 Moleküle in *lipid rafts* keine übergeordnete Rolle, da auch Antikörperfragmente ohne Fc-Teil (F(ab'2)) die Clusterbildung induzieren konnten. In derselben



Studie konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Antikörper CD20 in *lipid rafts* zu organisieren von den jeweiligen Epitopen abhing, die die untersuchten Antikörper erkannten (Li *et al*, 2004).

Das Schlüsselmolekül der klassischen Komplementaktivierung ist C1q, ein aus sechs heterotrimeren Kollagen-ähnlichen Fasern bestehendes hexameres Protein mit globulären „Köpfchen“, das sowohl IgG als auch IgM-Moleküle binden kann (Cooper, 1985; Gaboriaud *et al*, 2011). Die über Antikörper vermittelte Komplementaktivierung hängt von verschiedenen Faktoren wie Antigendichte, Antikörperisotyp und der Beweglichkeit des Antigen-Antikörperkomplexes in der Plasmamembran ab (Bindon *et al*, 1988). Während Rituximab *in vitro* erwiesenermaßen CDC sowohl in Tumorzelllinien als auch in primären Tumorzellen induzieren konnte (Li *et al*, 2004; Beum *et al*, 2008), bleibt der Beitrag des Komplementsystems am klinischen Erfolg des Antikörpers weiterhin umstritten (Beers *et al*, 2009). In einer Studie von Di Gaetano *et al*. konnte die einmalige Gabe von Rituximab (einen Tag nach der Tumorzelleninjektion) in Mäusen das Anwachsen von *intra vena* (*i.v.*) applizierten Zellen einer mit humanem CD20 transfizierten murinen Lymphomlinie verhindern, während die Kontrollgruppe innerhalb von 30 Tagen an Tumoren in verschiedenen Lokalisationen verstarb.

Während die Abwesenheit von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophilen und T-Zellen keinen Einfluss auf den Therapieerfolg der Mäuse hatte, zeigten Rituximab und 1F5 in C1q-*knockout* (engl., k.o.) -Mäusen ohne C1q Molekül keine tumorprotektiven Eigenschaften (Di Gaetano *et al*, 2003). Des Weiteren schien auch die Tumorlast einen Einfluss auf die *in vivo* Effektivität verschiedener CD20-gerichteter Antikörper zu haben. So zeigte eine Studie, dass die Aktivierung des Komplementsystems durch einen Typ I Antikörper ausschlaggebend für den Therapieerfolg bei Mäusen mit geringer Tumorlast war. Während in Mäusen mit geringer Tumorlast bereits die Anwesenheit einer Effektorquelle (z.B. CDC) für den Therapieerfolg ausreichte, waren im Modell mit einer hohen Tumorlast sowohl CDC als auch FcR-vermittelte Effekte für den Therapieerfolg der eingesetzten CD20-gerichteten Antikörper unabdingbar (Boross *et al*, 2011). In einer anderen Studie wiederum wurde gezeigt, dass verschiedene CD20-gerichtete Antikörper auch in Mäusen, die an verschiedenen Stellen der Komplementkaskade k.o.-Mutationen trugen, effektiv B-Zellen deletierten (Uchida *et al*, 2004). Zusätzlich wurde in Patienten, die an chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) litten und mit Rituximab behandelt wurden, ein Verbrauch verschiedener Komplementfaktoren im Serum nachgewiesen. Wurde das Serum dieser behandelten Spender in C3b-Opsonisierungsversuchen mit CD20<sup>pos</sup> Zellen eingesetzt, mussten zusätzlich entweder Serum unbehandelter Spender oder C2 supplementiert werden, um eine Opsonisierung der Zielzellen nachzuweisen (Kennedy *et al*, 2004).

Besonders bei Patienten mit einer hohen Anzahl zirkulierender B-Zellen trug das Komplementsystem außerdem zum Auftreten moderater bis schwerer Nebenwirkungen bei, die speziell bei der ersten Infusion von Rituximab auftraten. Dabei korrelierten die Schwere der aufgetretenen Nebenwirkungen sowohl mit der Anzahl zirkulierender B-Zellen vor Therapiebeginn, als auch mit dem

Grad der Komplementaktivierung und der damit verbundenen Freisetzung von aktivierenden Komplementspaltprodukten, Zytokinen und Interleukinen (Van Der Kolk *et al*, 2001). Eine Studie aus dem Jahr 2008 legt die Vermutung nahe, dass die Rituximab-vermittelte Anlagerung der Komplementkomponente 3b die Interaktion des Fc-Teils von Rituximab mit seinem aktivierenden FcγRIIIa (CD16a) auf NK-Zellen deutlich erschwerte. In ADCC Versuchen mit aufgereinigten NK-Zellen als Effektoren wurde gezeigt, dass C5 depletiertes Serum den Rituximab-vermittelten NK-Zell-ADCC eingesetzter gegenüber Raji Zellen verhinderte, während hitzeinaktiviertes C5-depletiertes Serum keinen Einfluss auf den NK-Zell-ADCC zeigte (Wang *et al*, 2008).

Im Jahr 2010 wurde der CD20-gerichtete Antikörper Ofatumumab zur Behandlung der nach Fludarabin- und Alemtuzumabbehandlung refraktär auftretenden chronischen lymphatischen Leukämie zugelassen (Coiffier *et al*, 2008; Osterborg *et al*, 2015). Ofatumumab wurde mit einer Reihe weiterer CD20-gerichteter Antikörper aus Hybridomen transgener Mausstämme aufgrund seiner starken Bindung an CD20-exprimierende Zellen sowie seiner herausragenden ADCC Effektivität selektioniert. Er zeigte bereits in frühen Stadien der Entwicklung eine dem Antikörper Rituximab überlegene *in vitro* CDC Aktivität sowie im Vergleich zu Rituximab eine signifikant langsamere *off-rate* nach Antigenbindung (Teeling *et al*, 2004). Während die Bindung von Rituximab und vieler weiterer CD20-gerichteter Antikörper an CD20 von bestimmten Aminosäureresten des großen extrazellulären *loops* (Alanin an Position 170 Prolin an Position 172) vermittelt werden (Polyak & Deans, 2002), zeigten Studien zum Epitopmapping schließlich, dass Ofatumumab im Vergleich zu Rituximab ein anderes Epitop des Antigens CD20 band (Abbildung 2). Dieses beinhaltete nicht nur andere Bereiche des großen extrazellulären *loops* (N-terminal des typischen Rituximabmotivs gelegen), sondern umfasste auch Bereiche des kleinen extrazellulären *loops* (Teeling *et al*, 2006).

Während Ofatumumab in *in vitro* CDC Versuchen bereits mit geringen Konzentrationen C1q effizient CDC der Tumorzelllinien oder primären Tumorzellen vermittelte, zeigten Zellen, die mit Rituximab vorinkubiert wurden, eine geringere C1q Bindung und dementsprechend auch geringere CDC-Lyseraten. Die Autoren vermuten, dass Ofatumumab durch sein verändertes Bindungsepitop die Komplementfaktoren vermutlich effizienter in die Nähe der Zellmembran fixiert, was später zu einer stabileren Aktivierung der Kaskade und des Membranangriffskomplexes (membrane attack complex, MAC) führt (Pawluczko *et al*, 2009). Besonders bei Tumorerkrankungen, die aufgrund geringer CD20-Expressionen auf eine Therapie mit Rituximab nicht gut ansprachen, konnte eine Überlegenheit von Ofatumumab *in vitro*, aber auch *in vivo* nachgewiesen werden (Barth *et al*, 2015).

Der Vergleich zwischen Rituximab und Ofatumumab wird bis zum heutigen Tag in klinischen Studien untersucht. Sowohl die Effektivität von Rituximab und Ofatumumab als *single agent* nach Rituximab Kombinationstherapie rezidivierend auftretender B-Zell NHL (HOMER, ClinicalTrials.gov Identifizierungsnummer: NCT01200589) als auch deren Potential als Teil der Erhaltungstherapie des

rezidivierenden oder refraktären diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (engl.: *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) in Vorbereitung auf eine autologe Stammzelltransplantation (ORCHARRD Studie, van Imhoff *et al*, 2016) war Gegenstand verschiedener klinischer Studien. Die beiden Behandlungsregime der Kombination aus Chemotherapie und therapeutischem Antikörper unterschieden sich weder im progressionsfreien Überleben, ereignisfreies Überleben oder im Gesamtüberleben nach zwei Jahren signifikant. Zusätzlich wird Ofatumumab bei der Therapie refraktärer oder schwer zu behandelnder Erkrankungen nach bereits erfolgtem Einsatz von Rituximab in mehreren Indikationen auf seine Wirksamkeit in klinischen Studien getestet (z.B. beim follikulären Lymphom (FL), ClinicalTrials.gov Identifizierungsnummer: NCT00394836; bei der CLL, ClinicalTrials.gov Identifizierungsnummer: NCT01123356; niedrigmaligne NHL in Kombination mit Bortezomib, ClinicalTrials.gov Identifizierungsnummer: NCT01119794).

#### 1.3.4 Typ II- CD20 Antikörper

Die Entwicklung des CD20-gerichteten Typ II Antikörpers Obinutuzumab sollte einige Limitationen der Rituximabtherapie aufheben und die Behandlung von Rituximab-resistenten Erkrankungen ermöglichen (zusammengefasst in: Owen & Stewart, 2015). Im Jahr 2013 wurde Obinutuzumab von der FDA als erster Typ II CD20-gerichteter Antikörper in Kombination mit Chlorambucil für die Behandlung von Patienten mit vorher unbehandelter CLL zugelassen (National Cancer Institute at the Institutes of Health, 2013). Zusätzlich erfolgte eine weitere FDA-Zulassung im Jahr 2016, nach der Obinutuzumab zur Behandlung des follikulären Lymphoms eingesetzt werden darf, wenn Patienten von vorherigen Behandlungsregimen in Kombination mit Rituximab nicht profitierten (U.S. Food and Drug Administration, 2016).

Obinutuzumab ist ein glykoengineerter IgG1 Antikörper, der aufgrund einer reduzierten *core*-Fukosylierung eine höhere Affinität zu dem aktivierenden FcγRIIIa (CD16a) aufweist (Nimmerjahn & Ravetch, 2005). Der Antikörper Obinutuzumab wurde durch die Humanisierung des parentalen, murinen Antikörpers B-Ly1 (Umana *et al*, 2015) entwickelt und zeigte im Vergleich zu seinem parentalen murinen Antikörper überlegene direkt-vermittelte Effekte. Eine Aminosäuresubstitution an Kabat-Position 11 in der *elbow-hinge*-Region des Antikörpers vermittelte die Fähigkeit der effizienten Fab-vermittelten Zelltodinduktion. Neben den im Vergleich zu Rituximab stärkeren direkten, Fab-vermittelten Effekten, zeigte Obinutuzumab zudem eine erhöhte ADCC Aktivität sowie effiziente B-Zelldepletion sowohl *in vitro* als auch in *in vivo* Mausmodellen. In einem nicht-humanen Primatenmodell depletierten sowohl Rituximab als auch Obinutuzumab B-Zellen aus dem peripheren Blut gleich effizient. In den lymphatischen Geweben wie Lymphknoten und Milz jedoch depletierte Obinutuzumab die B-Zellen signifikant besser als Rituximab (Mössner *et al*, 2010; Alduaij *et al*, 2011).

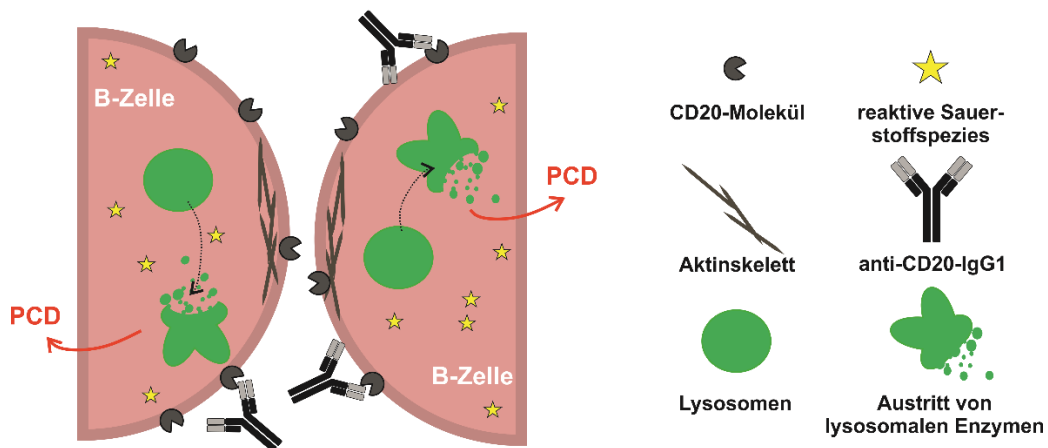
Auch ein anderer therapeutischer Typ II-Antikörper (Tositumomab) wurde in einer Studie von Beers *et al.* in einem transgenen Mausmodell auf seine Effektivität hin untersucht, CD20<sup>pos</sup>-Zellen zu depletieren. Tositumomab depletierte die B-Zellen sowohl im Blutkreislauf als auch in den lymphatischen Geweben erheblich länger als die beiden eingesetzten Vergleichsantikörper Rituximab und 1F5. Ein Einfluss des Komplementsystems auf die B-Zelldepletion wurde untersucht, konnte aber nicht nachgewiesen werden (Beers *et al.*, 2008).

Während die Komplementaktivität von Typ I-Antikörpern von deren Fähigkeit abhängt, deren Antigen CD20 in *lipid rafts* zu organisieren, wurde der durch Typ II-Antikörper induzierte programmierte Zelltodmechanismus als *lipid raft*- und caspaseunabhängig beschrieben (Chan *et al.*, 2003). Bereits in der 1980er Jahren wurde die Bindung von einigen Antikörpern an CD20 mit der Blockade von Zellzyklusaktivierung und Differenzierung der B-Zelle in Verbindung gebracht (Tedder *et al.*, 1986). Später wurde die Aktivierung von Apoptose durch monoklonale CD20-gerichtete Antikörper mit verschiedenen Lymphomzelllinien beschrieben. Während Typ I-Antikörper wie Rituximab Apoptose ausschließlich durch die Quervernetzung des CD20 Antigens (Anwesenheit eines kreuzvernetzenden Antikörpers) auslösten (Shan *et al.*, 1998), induzieren Typ II-Antikörper wie Tositumomab und Obinutuzumab apoptoseunabhängigen programmierten Zelltod (engl. *Programmed cell death*, PCD) auch ohne Quervernetzung. Dabei wurde der Grad an PCD, der durch verschiedene CD20-gerichtete Antikörper induziert werden konnte, mit deren Fähigkeit in Verbindung gebracht, sog. homotypische Aggregation der B-Zellen zu induzieren (Chan *et al.*, 2003). Homotypische Aggregation von B-Zellen nach Antikörperbindung war bereits im Zusammenhang verschiedener anderer Antigene wie CD19, CD40 oder HLA-D bekannt. Die hervorgerufene homotypische Aggregation war das Ergebnis einer durch die Verknüpfung verschiedener B-Zelloberflächenproteine eingeleiteten Signaltransduktionskaskade, die die Aktivierung verschiedener Zelloberflächen-Adhäsionsrezeptoren zur Folge hat (Kansas & Tedder, 1991).

Andrei Ivanov und Kollegen zeigten, dass eine Reorganisation des Aktinskeletts der B-Zelle sowohl für die durch CD20-gerichtete Antikörper induzierte homotypische Aggregation als auch PCD ausschlaggebend war. Wurden Zielzellen mit dem Inhibitor Latrunculin B behandelt, der die Polymerisierung von Aktin inhibiert, konnte die durch CD20-Antikörper induzierte homotypische Aggregation und PCD verhindert werden. Der durch Typ II-Antikörper vermittelte PCD war schnell, caspaseunabhängig und zeigte eine Beteiligung der Lysosomen (Ivanov *et al.*, 2009). Die Vergrößerung des lysosomalen Kompartiments und deren damit assoziierte Instabilität ist bereits für andere nicht-apoptotische Zelltodmechanismen beschrieben (Groth-Pedersen *et al.*, 2007). Die Arbeitsgruppe um Ivanov *et al.* schlussfolgerten, dass durch die Bindung CD20-gerichteter TypII-Antikörper an Zielzellen deren Lysosomen zunächst anschwellen, die Durchlässigkeit der Lysosomenmembran zunimmt und schließlich lysosomale Enzyme wie Granzym B in die Zelle

entlassen werden, die dann den Zelltod einleiten (Ivanov *et al*, 2009). Zusätzlich zu Aktinreorganisation und Durchlässigkeit der Lysosomenmembran wurde im Jahr 2012 die Verbindung zwischen Typ II-induziertem Zelltod und der Fähigkeit der Antikörper, in den Zielzellen reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) zu produzieren, hergestellt (Honeychurch *et al*, 2012).

Der durch Typ II Antikörper PCD wurde zudem als eine Form des immunogenen Zelltodes definiert (Cheadle *et al*, 2013), der bereits als Wirkmechanismus für einige wenige Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Bortezomib beschrieben ist (zusammengefasst in: Galluzzi *et al*, 2016). Die



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der durch Typ II-Antikörper induzierten homotypischen Aggregation und die daraus resultierende Aktivierung eines caspaseunabhängigen programmierten Zelltodmechanismus.** Durch die Bindung von Typ II-Antikörpern an CD20 kommt es zu einer Polymerisierung von Aktinfilamenten in der B-Zellmembran, die zur Verklumpung der behandelten Zellen führt. Der induzierte Zelltod ist vergesellschaftet mit einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und einer Beteiligung des lysosomalen Kompartiments. Durch die Freisetzung lysosomaler Granzyme wird schließlich die Zerstörung der Zelle eingeleitet. Der durch Typ II Antikörper induzierte Zelltod ist zudem als immunogen beschreiben.

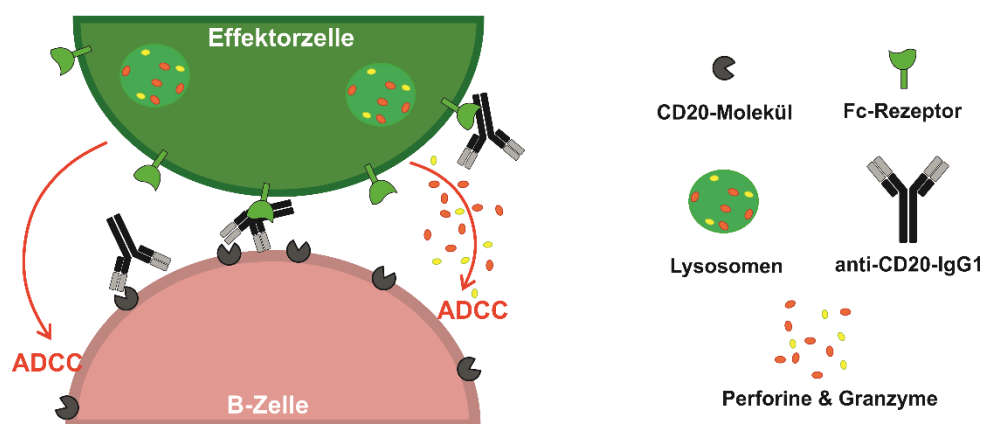
Freisetzung von sog. *Damage associated molecular patterns* (engl. DAMPs) wie Hitzeschockproteinen (HSP), *High mobility group box 1* (HMGB1) und Adenosintriphosphat (ATP) sterbender Zellen sind als charakteristische Merkmale für den immunogenen Zelltod beschrieben (Kroemer *et al*, 2013). Die Aktivierung dendritischer Zellen (oder anderer antigenpräsentierender Zellen) erfolgt dabei durch DAMPs sterbender Tumorzellen und kann über die Freisetzung von Zytokinen zum *priming* von T-Zellen führen. Tumorzellen können so als Teil einer adaptiven Immunantwort erkannt und eliminiert werden, was zu einer langfristigen Tumorkontrolle führen kann (Mechanismen zu immunogenen Zelltod zusammengefasst in: Kroemer *et al*, 2013; Galluzzi *et al*, 2016). Dass die Generierung von T-Zellantworten im Zuge einer tumorgerichteten Immuntherapie von Vorteil sein kann, ist in Bezug auf einige Chemotherapeutika, onkolytische Viren und der photodynamischen Therapie gezeigt (Galluzzi *et al*, 2016). Inwieweit Typ II-Antikörper in der Therapie verschiedener B-Zellmalignitäten von ihrer Fähigkeit immunogenen Zelltod zu induzieren profitieren, müssen klinische Studien zeigen. Besonders das Auftreten verschiedener Resistenzen von Tumorzellen gegen die gängige Rituximabtherapie führte zur Weiterentwicklung neuer Antikörperformate wie Obinutuzumab.

Werden CLL-Zellen *ex vivo* aus dem peripheren Blut mit CD40 stimuliert, entwickeln sie Resistenzen gegen gängige Chemotherapeutika wie bspw. Fludarabin (Romano *et al*, 1998). Gleichzeitig wurden jedoch CD40 stimulierte CLL-Zellen zugänglich für Typ II-Antikörper vermittelten PCD allein oder in Kombination mit verschiedenen zytotoxischen Medikamenten wie Bendamustin, Chlorambucil oder Fludarabin, die ohne den Antikörper keinerlei Wirkung zeigten. Die Autoren schlussfolgerten, dass Obinutuzumab besonders vielversprechend bei Patienten eingesetzt werden könnte, bei denen Resistenzen gegen gängige Chemotherapeutika auftraten (Jak *et al*, 2011).

Inwiefern die direkten Effekte des Typ II-Antikörpers Obinutuzumab zu dessen Wirkmechanismen in klinischen Situationen beiträgt, ist schwer zu sagen. Dennoch ist Obinutuzumab Gegenstand mehrerer anlaufender, klinischer Studien, zum Beispiel zur Behandlung der CLL (ClinicalTrials.gov Identifizierungsnummer: NCT02371590 oder NCT03153514). Die Ergebnisse einer abgeschlossenen Phase-III Studie (CLL11, insgesamt 781 Patienten) zeigte, dass die Kombination Obinutuzumab+Chlorambucil das Gesamtüberleben zuvor unbehandelter CLL-Patienten signifikant im Vergleich zur Kombination Rituximab+Chlorambucil oder der Monotherapie mit Chlorambucil verlängerte (Goede *et al*, 2015). Ziel der vielen verschiedenen klinischen Studien (zusammengefasst in: Tobinai *et al*, 2017; van Oers, 2012) ist, sowohl die für den Patienten effektivste Kombinationstherapie zu bestimmen, als auch Behandlungssituationen festzustellen, in denen monoklonale Antikörper wie Obinutuzumab als Monotherapie zur Behandlung verschiedener B-Zell-Malignitäten zur Anwendung kommen können.

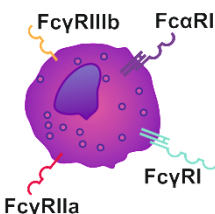
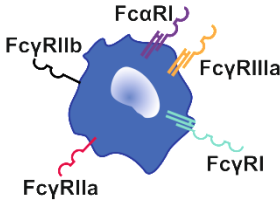
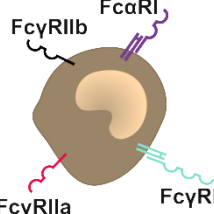

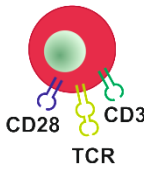
### 1.3.5 Fc/FcR Interaktionen CD20-gerichteter Antikörper

Während der Beitrag des Komplementsystems zur therapeutischen Effektivität CD20-gerichteter Antikörper umstritten bleibt und der tatsächliche Anteil der direkt vermittelten Effekte am



**Abbildung 7: Der Mechanismus der Antikörper-vermittelten ADCC ist von der Interaktion des Fc-Teils und FcR auf Immunzellen abhängig.** Antikörperbindung an CD20<sup>pos</sup> Zellen vermittelt die Interaktion zwischen Antikörper-Fc und FcR auf bspw. NK-Zellen. Verschiedene Wege können zur NK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse beitragen wie a) die Freisetzung von Perforinen und Granzymen, b) Freisetzung von Zytokinen und c) der Aktivierung von Todesrezeptoren der TNF-Familie (zusammengefasst in: Wang *et al*, 2015).

Therapieerfolg von Obinutuzumab bisher ungeklärt ist, ist die Interaktion des Fc-Teils eines therapeutischen Antikörpers mit aktivierenden FcγR auf Effektorzellen wie NK-Zellen für deren *in vivo* Aktivität hinreichend belegt (Clynes *et al*, 2000). NK-Zellen stellen für die Antikörpertherapie eine effektive Effektorzellpopulation dar, da sie zum einen außer dem aktivierenden FcγRIIIa keinen inhibierenden FcR (wie FcγRIIIb) auf ihrer Oberfläche exprimieren und zum anderen bereits bei sehr geringen Effektor-zu-Tumorzell-(E:T-) Verhältnissen sehr effektiv Tumorzellen eliminieren (zusammengefasst in: Guillerey *et al*, 2016; Wang *et al*, 2015). Während NK-Zellen ADCC in Zielzellen induzieren, indem sie Perforine und Granzyme freisetzen, können auch andere FcγR tragende Immunzellen wie Neutrophile, Monozyten oder Makrophagen an der Eliminierung von Tumorzellen

Granulozyten	Makrophagen	Monozyten	NK-Zellen	T-Zellen
				
Funktion				
ADCC Phagozytose Zytokinfreisetzung	ADCC Phagozytose Zytokinfreisetzung	ADCC Phagozytose Zytokinfreisetzung	Zytotoxizität ADCC Zytokinfreisetzung	Zytotoxizität Zytokinfreisetzung
Zellen pro µL Blut				
1800 - 7000	-	200 - 600	120 - 350	300 - 900
aktivierende Zytokine				
GM-CSF G-CSF IFN-γ	GM-CSF IFN-γ	GM-CSF IFN-γ	IL-2	IL-2

**Abbildung 8: Schematische Übersicht verschiedener Immuneffektorzellen und deren Fc-Rezeptoren.** Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen tragen eine unterschiedliche Ausstattung an Fc-Rezeptoren, die sie dazu befähigt, verschiedene Effektorfunktionen auszulösen. Die Anzahl pro µL Blut schwankt je nach Zellpopulation deutlich. Zusätzlich können diese Immunzellen über verschiedene Zytokine stimuliert werden. Während IgG Antikörper besonders effizient NK-Zellen für ADCC aktivieren (FcγRIIIa/CD16a), können IgA Antikörper über FcαRI (CD89) sowohl Granulozyten (die zahlenmäßig größte Effektorzellpopulation im Blut) als auch Monozyten und Makrophagen für Wirkmechanismen wie ADCC und Phagozytose rekrutieren. (Daten dieser Abbildung entstammen Kellner *et al.*, 2011).

beteiligt sein (zusammengefasst in: Glennie *et al*, 2007; Hernandez-Ilizaliturri *et al*, 2003). Meist werden mehrere unterschiedliche FcR auf einer Immunzelle exprimiert, die in ihrer Gesamtheit sowohl aktivierende- als auch inhibitorische Signale in das Zellinnere weiterleiten können (Kellner *et al*, 2011). Aktivierende FcR tragen sog. *immunoreceptor tyrosine-based activation- Motive* (ITAM) (Reth, 1989) und sind an der Vermittlung von Effektormechanismen wie Phagozytose, ADCC und Antigenpräsentation beteiligt (Nimmerjahn & Ravetch, 2008) (siehe Abbildung 8). Bereits im Jahr 2000 zeigte Clynes *et al.* in einer Studie, dass die Therapie mit CD20 Antikörpern in FcγR k.o. Mäusen abhängig von auf deren Effektorzellen exprimierten aktivierenden FcγR waren. Während in Mäusen, in deren Effektorzellen inhibitorische FcγR vollständig fehlten, *in vitro* eine höhere ADCC der

Tumorzellen zeigten, konnte die Größenzunahme von Tumoren in Mäusen, deren Effektorzellen keine aktivierenden FcγR exprimierten, nicht verhindert werden (Clynes *et al*, 2000).

Daten aus klinischen Studien belegen, dass FcγR-Polymorphismen einen Einfluss auf das Ansprechen der Patienten auf CD20-gerichtete Antikörpertherapie haben können. So kann beispielsweise FcγRIIIA an der Aminosäureposition 158 entweder ein Phenylalanin (F) oder ein Valin (V) tragen. So banden therapeutische IgG1-Antikörper effizienter an NK-Zellen, die die FcγRIIIa-158V Variante homozygot exprimieren, als jene, die ausschließlich FcRIIIA-158F oder beide Allele heterozygot exprimierten (Koene *et al*, 1997). In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Patienten, die an verschiedenen B-Zellmalignitäten (FL, Morbus Waldenström, DLBCL) litten, aufgrund der verschiedenen exprimierten Allele des FcRIIIa-Gens unterschiedlich auf eingesetzte Antikörpertherapien ansprachen (zusammengefasst in: Weng & Levy, 2003; Lim *et al*, 2010). Blutzellen des myeloischen Kompartments exprimieren verschiedene FcγR, die sowohl ITAM als auch ITIM-Motive tragen (Abbildung 8). Monomere IgG1 Antikörper binden FcγRIIa mit niedriger Affinität, doch als einziger der FcγR bindet FcγRIIa auch Antikörper der IgG2 Subklasse. Für FcγRIIa ist ebenfalls ein Polymorphismus beschrieben, der die Bindungsaffinität für IgG2 an den Rezeptor beeinflusst. Während IgG2 nicht an FcγRIIa-R131 bindet, der an Aminosäureposition 131 ein Arginin trägt (FcγRIIa-R131), können IgG2 Antikörper Phagozytose von IgG2-gecoateten Partikeln über FcγRIIa-H131 vermitteln, der statt des Argininrests ein Histidin trägt (Warmerdam *et al*, 1990; Bournazos *et al*, 2009). Später konnte ebenfalls gezeigt werden, dass IgG1 Antikörper neben ADCC auch antikörperabhängige zelluläre Phagozytose über FcγR exprimierende Makrophagen oder auch PMN vermitteln (Leidi *et al*, 2009; Golay *et al*, 2013).

FcR können jedoch auch an einer Verminderung der CD20 Expression der Zielzellen beteiligt sein, was im Umkehrschluss die Therapie mit CD20-gerichteten Antikörpern wie Rituximab, Ofatumumab oder Obinutuzumab erschwert. Das beobachtete Phänomen des sog. „shavings“ und der dem *shaving* zugrundeliegende Prozeß der Trogozytose wird durch Monozyten, Makrophagen oder PMN vermittelt, die zwar über Antikörper Fc/FcR-Interaktionen an die Zielzellen binden, dann jedoch gebundene Membranstücke zusammen mit dem Antigen von den Zielzellen entfernen, wobei sie die Zielzellen nicht eliminieren (Daubeuf *et al*, 2010; Valgardsdottir *et al*, 2017; Beum *et al*, 2011; Pedersen *et al*, 2011). Patienten, deren B-Zellmalignität bereits rezidivierend oder refraktär auftreten, und deren Erkrankung aufgrund erworbener Resistenzmechanismen nicht mehr auf eine Rituximabtherapie ansprechen, stellen behandelnde Ärzte nach wie vor große Herausforderungen. Neben dem Verlust des Zielantigens auf der Oberfläche von Zielzellen durch *shaving* werden auch andere Mechanismen diskutiert, die zur Unempfindlichkeit von Tumoren gegenüber einer Therapie mit Rituximab beitragen können, wie z.B. epigenetische Herunterregulierung der CD20 Expression (Hiraga *et al*, 2009), Polymorphismen des FcγRIIIa oder die



Exprimierung von Komplementregulatoren wie CD46, CD55 und CD59 (Bonavida, 2007; Hu *et al*, 2011).

#### 1.4 Die Biologie humaner IgA Antikörper

Die Wissenschaftler Grabar und Williams entdeckten bereits 1953 in Immundiffusions-Elektrophoreseversuchen mit humanem Serum das „ $\beta_2$ -Globulin“, das heute besser als IgA Antikörper bekannt ist (Grabar & Williams, 1953). Dass es sich bei IgA Antikörpern um Glykoproteine handelt, die zum Teil scheinbar immunologische Eigenschaften mit anderen Gammaglobulinen teilen, zeigten Heremans *et. al.* anschließend 5 Jahre später (Heremans *et al*, 1959). Antikörper vom IgA-Isotyp setzen sich wie alle anderen Immunglobuline aus je zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten zusammen. Während sie über ihre Fab-Region eine große Anzahl verschiedener Antigene erkennen und binden können, binden IgA Antikörper über ihren Fc-Teil bspw. den IgA spezifischen Fc-Rezeptor Fc $\alpha$ RI (CD89). Im Menschen existieren zwei Subklassen von IgA Antikörpern, IgA1 und IgA2, die sich in Vorkommen und Eigenschaften unterscheiden. Im Gegensatz zur IgA1-Subklasse sind zwei verschiedene IgA2-Allotypen, IgA2m(1) und IgA2m(2), beschrieben. Die schweren und leichten Ketten aller IgA Antikörper sind mit einer unterschiedlichen Anzahl von Disulfidbrücken an verschiedenen Positionen im Molekül miteinander verknüpft, die sich je nach Subklasse und Allotyp unterscheiden. Anders als bei IgG Antikörpern, die Disulfidbrücken in ihren Gelenkregionen ausbilden, werden IgA1- und IgA2-Antikörper durch Disulfidbrücken zwischen den C $\alpha$ 2-Domänen stabilisiert. Zusätzlich sind bei IgA1 und IgA2m(2)-Antikörpern die leichten und schweren Ketten über Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft. Die Disulfidbrücken bilden sich beim IgA2m(1)-Allotyp ausschließlich zwischen den beiden leichten Ketten aus. Die schweren und leichten Kette werden hier über nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert. Im Vergleich zu IgA2- tragen IgA1-Antikörper eine um 16 Aminosäuren (engl. *amino acid*, aa) verlängerte Gelenkregion, die zudem bis zu 6 O-Glykosilierungsstellen trägt. Alle IgA Antikörper tragen zudem mehrere N-Glykosilierungsstellen, wobei die schweren Ketten von Antikörpern der IgA1-Subklasse zwei Glykosilierungsstellen (pro schwere Kette), bei IgA2-Antikörper insgesamt vier Glykosilierungsstellen (pro schwere Kette) definiert sind.

Antikörper vom IgA-Isotyp treten sowohl in monomerer-, dimerer- und sekretorischer Form auf. Mit 2-3mg/mL ist monomeres IgA (90% IgA1 vs. 10% IgA2) im menschlichen Serum der mengenmäßig zweithäufigste Antikörper nach IgG (Kerr, 1990; Woof & Kerr, 2006). Bereits 1970 wurde die sog. Joining-chain (J chain) in dimeren, aber nicht in monomeren IgA Antikörpern nachgewiesen (Halpern & Koshland, 1970). In Plasmazellen der *Lamina propria* werden IgA-Moleküle über ihr sog. *tail piece* zusammen mit der J chain zu dimeren (IgM-Moleküle sogar zu pentameren) Strukturen verknüpft. Sekretorisches IgA (dimeres IgA verknüpft mit der sekretorischen Komponente, S-IgA) wird wiederum in einem Prozeß der sog. Transzytose auf nahezu alle mukösen Epithelien (z.B. respiratorisches

System, Gastrointestinaltrakt etc.) sekretiert, wo es als erste Abwehrlinie des Immunsystems gegen Pathogene beschrieben ist (zusammengefasst in Mantis *et al*, 2011). Bei der Transzytose bindet das über die J chain verknüpfte dimere IgA an den an der basolateralen Seite epithelialer Zellen exprimierte Polymeric Immunoglobulin Rezeptor (engl., pIgR). Dass die Bindung der Antikörper an den pIgR dabei von einer ausschließlich die J chain betreffende Bindestelle abhängt, wurde bereits 1984 gezeigt (Brandtzaeg & Prydz, 1984). Nach der Bindung des dimeren IgA Antikörpers an den pIgR wird der Komplex über einen Endozytoseprozeß zur apikalen Seite der epithelialen Zellen transportiert (zusammengefasst in Mostov, 1994). Bereits 1970 wurde in sekretorischem IgA ein Polypeptid von ca. 80kDa nachgewiesen, das kovalent an den Antikörper gebunden ist. Ob diese sog. Secretory Component (engl., SC) jedoch bereits während der IgA-Sythese oder erst später an den Antikörper bindet, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht näher erklärt werden (Tomasi *et al*, 1965). Erst später wurde die SC als der Teil des pIgR definiert, der nach der Transzytose durch die Epithelzelle proteolytisch von der Membran abgespalten wird (Musil & Baenziger, 1987) und dann entweder zusammen mit dem gebundenen IgA als S-IgA oder als Free Secretory Component (engl., FSC) ohne gebundenen Antikörper ins Lumen freigegeben wird (Mostov *et al*, 1984). S-IgA spielt bei der Abwehr von Pathogenen besonders auf intestinalen Epithelien eine entscheidende Rolle. Dabei kann S-IgA mit verschiedenen (Fab-abhängigen und -unabhängigen) Mechanismen Toxine und Pathogene zum Beispiel an der Anhaftung am intestinalen Gewebe hindern. So sind bspw. IgA Antikörper, die mit ihrer variablen Domäne Antigene binden, die direkt oder indirekt am Prozess des Eindringens von Pathogenen in intestinale Epithelien beteiligt sind, effizient in der Lage, diese Pathogene zu neutralisieren. Zusätzlich können IgA Antikörper bei der sog. „*Immune exclusion*“ einen schrittweisen Prozess einleiten, der das Eindringen von mikrobiellen Pathogenen/Antigenen oder Toxinen in das Intestinalgewebe verhindert. Dabei findet zuerst eine Agglutination der Pathogene durch Antikörper-vermittelte-Kreuzvernetzung statt. Später werden diese Ansammlungen von Erregern durch IgA Antikörper in Mukus eingeschlossen und über die Peristaltik abtransportiert. Die starke Glykosylierung von IgA-Molekülen und der SC ist ebenfalls an der Pathogenabwehr beteiligt. Zuckervermittelte Erkennung von Mikrobiota kann ohne die Beteiligung der Fab-Domäne stattfinden und spielt neben der Erkennung von Pathogenen auch bei der Interaktion von Kommensalen mit ihrem Wirt eine entscheidende Rolle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass S-IgA als erste Abwehrlinie gegen eindringende Pathogene ganze Organsysteme effektiv schützen kann. Neuere Erkenntnisse erweitern das Verständnis über die Funktion S-IgA Antikörpern in der Darmhomöostase. Für den Wirt nützliche Mikrobiota sind die Grundlage für eine gesunde Darmflora. S-IgA Antikörper spielen dabei eine Schlüsselrolle, indem sie bspw. zur Entstehung einzigartiger Nischen beitragen, die die Vielfalt des

Mikrobioms fördern und fördern (Funktion von sekretorischem IgA ausführlich zusammengefasst in Mantis *et al*, 2011; Pabst *et al*, 2016; Woof & Kerr, 2006).

### 1.5 Der IgA spezifische Fc-Rezeptor FcαRI (CD89)

Der Fc-Rezeptor für IgA Antikörper ist auf verschiedenen Immunzellen des myeloischen Kompartiments exprimiert. Während FcαRI auf Immunzellen wie Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, Monozyten, intestinalen dendritischen Zellen (DCs, engl. *dendritic cells*) und Kupffer Zellen nur zu einem bestimmten Maß exprimiert ist, stellen neutrophile Granulozyten die Immunzellpopulation mit der am Abstand stärksten FcαRI Expression dar. Im Jahr 2003 untersuchte die Arbeitsgruppe um Hamre *et al.* die FcαRI-Expression verschiedener humaner Gewebetypen. Dabei konnten in Geweben wie den Mandeln oder des Appendix eine erhöhte Anzahl FcαRI<sup>pos</sup>-Zellen detektiert werden. In anderen Untersuchungsproben, wie bspw. in Lymphknoten, der Darmschleimhaut oder einer bronchoalveolären Lavage, waren im Vergleich vereinzelt FcαRI<sup>pos</sup>-Zellen nachweisbar. Zudem konnte die Gruppe nachweisen, dass es sich bei den in den Geweben nachgewiesenen FcαRI<sup>pos</sup>-Zellen zu einem Großteil um Neutrophile handelt (Hamre *et al*, 2003). Während das Expressionsniveau von FcαRI auf Neutrophilen in peripherem Blut und Geweben gleichbleibend hoch war, zeigten besonders vollständig ausgereifte Makrophagen keine Signale für eine FcαRI-Expression. Dabei ergab sich folgendes Muster: Monozyten mit hohen CD14-Expressionen zeigten auch eine hohe FcαRI-Expression. Verläuft die Reifung CD14<sup>pos</sup>-Monozyten in Richtung CD14<sup>neg</sup>-Makrophagen, verlieren sie zusammen mit CD14 auch FcαRI. Zudem zeigten Monozyten, die ihrerseits aus dem peripheren Blut gereinigt wurden, höhere Level an FcαRI als die Monozyten, die in den Gewebeproben nachgewiesen werden konnten (Hamre *et al*, 2003).

Bereits 1990 wurde der für IgA spezifische FcR (CD89) auch strukturell untersucht. Dabei konnte der Rezeptor eindeutig der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet werden (Maliszewski *et al*, 1990). Zwar ist die Aminosäuresequenz des Rezeptors von denen anderer FcR verschieden, genetisch ist FcαRI jedoch mit anderen Fc-Rezeptoren (wie bspw. FcγRI, -II und -III sowie FcεRI) verwandt. Des Weiteren konnten Gemeinsamkeiten der Sequenz von FcαRI mit denen von Rezeptoren aus dem sog. *leucocyte receptor cluster* wie z.B. *killer cell inhibitory receptors* (KIR) oder *leukocyte Ig-like receptors* (LIR/LILR/ILTs) nachgewiesen werden (zusammengefasst in Monteiro & van de Winkel, 2003). Die extrazellulären Domänen des Rezeptors sind insgesamt 206-, die intrazellulären Domänen insgesamt 41 Aminosäuren lang. Extra- und intrazelluläre Bereiche sind über eine transmembranäre Domäne miteinander verbunden (Maliszewski *et al*, 1990). Zwei Immunglobulin-ähnliche Strukturen, EC1 und EC2 (engl. *ExtraCellular region*) bilden den extrazellulären Bereich des Rezeptors.

Anders als bei anderen FcR, bei denen die Bindung an den Antikörper meist von einer proximal gelegenen Domäne vermittelt wird, ist bei der Bindung von FcαRI an IgA nur die distal gelegene EC1

beteiligt (Craig Morton *et al*, 1999). Während bei der Bindung von IgG Antikörpern an FcγR, jeweils ein FcR mit einem Fcγ-Molekül interagiert, binden jeweils zwei FcαRI Moleküle ein Fcα-Molekül (2:1 Stöchiometrie) (Herr *et al*, 2003). Dabei binden die IgA1- und IgA2-Antikörper mit gleicher Affinität (Mazengera & Kerr, 1990) und mit ihrem Fc-Teil am Übergang CH2-CH3 an FcαRI (Carayannopoulos *et al*, 1996). Genau wie der auf NK-Zellen exprimierte FcγRIIIa (CD16a) ist FcαRI ein ITAM-assoziiierter Rezeptor, der aus einer antikörperbindenden Domäne besteht (α-Kette), die über nicht kovalente Wechselwirkungen mit der signalweiterleitenden FcR γ-Kette assoziiert ist (Morton *et al*, 1995). Das Binden von IgA Antikörpern an ihren FcR-FcαRI kann eine Reihe verschiedener biologischer Prozesse initiieren, die sowohl Phagozytose, ADCC, die Freisetzung von Zytokinen als auch Antigenpräsentation umfassen (zusammengefasst in Monteiro & van de Winkel, 2003).

### 1.6 Präklinische Entwicklung von IgA Antikörpern für die Tumorthherapie

Den Grundstein des Erfolges für therapeutische IgG1 Antikörper legte eine Veröffentlichung der Forschungsgruppe um Brüggenmann *et al.*, in der IgG1 im Vergleich zu anderen IgG-Subklassen und Antikörperisotypen besonders effektiv, sowohl CDC als auch ADCC gegen eingesetzte Zielzellen vermitteln konnte (Brüggenmann *et al*, 1987). Bis heute ist die überwiegende Mehrheit aller zugelassener monoklonaler Antikörper vom IgG1 Isotyp. Besonders wenn der eingesetzte Antikörper über Effektorzellen oder die Aktivierung des Komplementsystems, also über seinen Fc-Teil, wirken soll, sind Antikörper mit einem IgG1-Rückgrat die bevorzugte Wahl. Gegenstand des Forschungsinteresses mehrerer Arbeitsgruppengruppen war und ist es herauszufinden, inwiefern sich auch Antikörper anderer Isotypklassen für den therapeutischen Einsatz eignen. Dabei wurden sowohl IgE, IgM und IgA Antikörper *in vitro*, *in vivo* und zum Teil auch in klinischen Studien mit zum Teil erfolgversprechenden Ergebnissen untersucht (zusammengefasst in Kretschmer *et al*, 2017). Trotz dieser intensiven Arbeit ist es bisher nicht gelungen, alternative Isotypen „*from bench to bedside*“ zu einer Zulassung für klinische Anwendungen zu bringen.

Während IgG1 Antikörper äußerst effizient NK-Zellen als Effektorzellen rekrutieren können, wurde das Potential einer anderen Effektorzellpopulation bereits in den 1970er Jahren erkannt. In <sup>51</sup>Chromfreisetzungsversuchen konnte gezeigt werden, dass polymorphnukleäre Zellen (PMN) äußerst effizient Antikörper-gebundene Zielzellen lysierten (Gale & Zighelboim, 1975). Später konnte gezeigt werden, dass sowohl ein anti-NIP-IgA2 als auch ein bispezifischer (FcαRI x HER-2/neu) Antikörper PMN vermittelte ADCC der jeweiligen spezifischen Zielzellen induzieren (Valerius *et al*, 1997). In den letzten 20 Jahren wurden verschiedene IgA Antikörper gegen verschiedene Zielantigene und deren therapeutische Wirksamkeit untersucht. So zeigte die Arbeitsgruppe um Thomas Valerius, dass chimäre HLA-Klasse-II-gerichtete IgA1, IgA2 und IgG1 eine vergleichbare Zytotoxizität gegen Lymphomzelllinien und primäre CLL Zellen vermitteln konnten, indem die verschiedenen

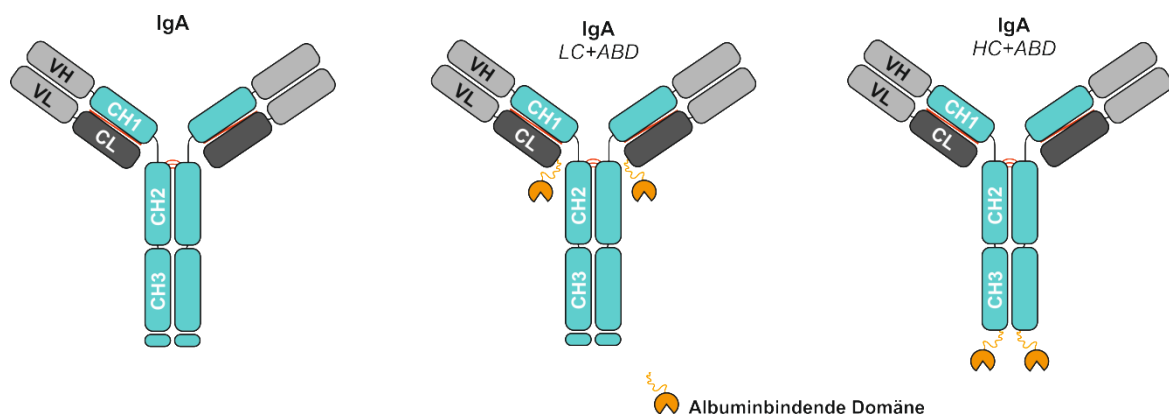
Antikörperisotypen unterschiedliche Effektormechanismen und -zellpopulationen rekrutierten (Dechant *et al*, 2002). Ebenso wurden IgA Antikörper für die Therapie solider Tumoren entwickelt, die bspw. variable Regionen zugelassener therapeutischer Antikörper wie Cetuximab (EGFR-gerichtet) oder Trastuzumab (HER-2-gerichtet) trugen. Sowohl IgA Antikörper, die gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) gerichtet sind, als auch EGFR-gerichtete IgA Antikörper zeigten *in vitro* als auch *in vivo* Effektivität gegen verschiedene Tumorzelltypen (Rouwendaal *et al*, 2016; Dechant *et al*, 2007; Boross *et al*, 2013). In derselben Studie entfaltete ein EGFR-gerichtetes IgA2 Molekül eine signifikant überlegene PMN-vermittelte ADCC-Aktivität im Vergleich zu einem Cetuximab-IgA1 Molekül. Diese Beobachtung veranlasste die Autoren dazu, ein IgA2-Molekül für die therapeutische Anwendung sowohl auf Proteinebene als auch dessen Glykosylierungsstruktur zu optimieren. Natürlicherweise können IgA Antikörper in Verbindung mit der J-Kette Dimere-Moleküle bilden. Das therapeutische Potential solcher dimerer IgA-Moleküle wurde z.B in einer Studie untersucht, in der EGFR-gerichtete IgA1 Antikörper in einem CHO-Zell-Produktionssystem stabil exprimiert und zusätzlich über die J-Kette kovalent miteinander verknüpft wurden. Während monomere und dimere IgA-Moleküle in ADCC Versuchen mit humanen PMN oder Monozyten als Effektorzellen eine gleiche Effektivität aufwiesen, vermittelte das dimere Molekül signifikant stärkere Fab-vermittelte Effekte in den Zielzellen als der monomere IgA Antikörper. Zusätzlich konnte ein pIgR-vermittelter Transport des IgA-Dimers in einem *in vitro*-Versuchsaufbau nachgewiesen werden (Lohse *et al*, 2011).

Die Produktion ausreichender Mengen spezifischer und biochemisch gut charakterisierter IgA Antikörperpräparationen war eine Limitation, die die therapeutische Weiterentwicklung dieser Moleküle über eine lange Zeit erschwerte. Im Jahr 2009 stellten Beyer *et al*. die Etablierung unterschiedlicher stabiler, antikörperproduzierender CHO-Zelllinien vor und charakterisierten die so hergestellten therapeutischen IgA Antikörper sowohl biochemisch als auch funktionell (Beyer *et al*, 2009). Auch andere Arbeitsgruppen arbeiteten an der Optimierung und Weiterentwicklung verschiedener Produktionssysteme zur Herstellung therapeutischer IgA Antikörper. Im Jahr 2015 wurde in einer Veröffentlichung eine effiziente Strategie zur Produktion monomerer und dimerer IgA Antikörper in einem transienten, humanen Expressionssystem vorgestellt, die es ermöglicht, therapeutische IgA Antikörper für unterschiedliche Anwendungsbereiche in relativ kurzen Zeitspannen herzustellen (Lorin & Mouquet, 2015). Da die Glykosylierung von IgA Antikörpern eine wesentliche Rolle in der Pharmakokinetik dieser Moleküle spielt, wurden IgA Antikörper verschiedener Spezifitäten außerdem in humanen Expressionssystemen produziert, die nicht nur Antikörper mit einem komplexen humanen Glykosylierungsmuster herstellen, sondern auch die Möglichkeit zum weiteren Glykoengineering geben, um Antikörperpräparationen zu erhalten, die definierte Glykostrukturen tragen (Hart *et al*, 2017). Eine weitere Schwierigkeit in Bezug auf die

Weiterentwicklung von IgA Antikörpern für anwendungsbezogenere Fragestellungen war unumstrittener Weise die Verfügbarkeit passender *in vivo*-Mausmodelle. Aufgrund eines fehlenden murinen Homologs zu dem humanen Fc $\alpha$ RI waren *in vivo* Untersuchungen zu Pharmakokinetik oder Effektivität therapeutischer IgA Antikörper erst möglich, als im Jahr 1999 ein transgenes Mausmodell vorgestellt wurde, das Fc $\alpha$ RI immunologisch äquivalent zum humanen System auf Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten und einer Teilmenge von Monozyten exprimierte (van Egmond *et al.*, 1999). Durch das Vorhandensein dieses Mausmodells konnten in der Vergangenheit verschiedene IgA-Formate schließlich auch *in vivo* auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden. Strategien zur Weiterentwicklung therapeutischer IgA Antikörper für die klinische Anwendung soll Gegenstand des nächsten Kapitels sein.

### 1.7 Strategien zur Optimierung von IgA-Molekülen für die Tumorthherapie

Die Optimierung von IgG Antikörpern und - Antikörperderivaten für die Tumorthherapie ist durch verschiedenste Varianten des Fc-Protein- und/oder Glykoengineerings bereits umsetzbar. Das Verändern der Proteinsequenz oder des Glykosylierungsprofils eines therapeutischen Antikörpers kann dabei die Effektivität der induzierten ADCC

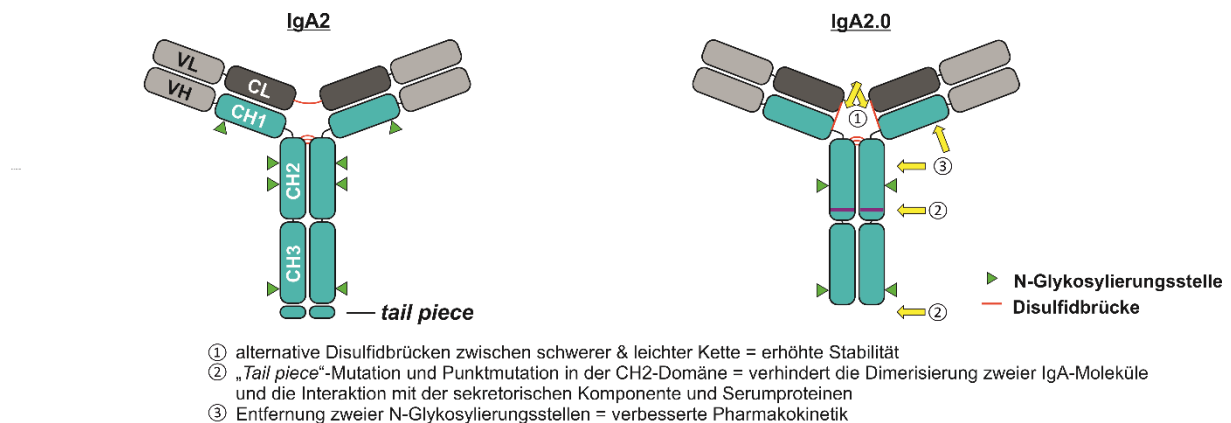


**Abbildung 9: Konzept zur Verlängerung der Serumretentionszeit eines HER2-gerichteten IgA-Moleküls.** Die Verknüpfung eines IgA2-Wildtypantikörpers mit einer albuminbindenden Domäne (ABD) konnte die Serumretentionszeit der getesteten Moleküle signifikant verbessern. Die ABD wurde dabei einmal an die leichte -- und einmal an die schwere Kette des Ausgangsmoleküls angehängt um den Antikörper an Albumin zu binden. Albumin bindet ebenso wie IgG Antikörper an den neonatalen Fc-Rezeptor. IgG Antikörper können daher Serumhalbwertszeiten von bis zu 21 Tagen erreichen. Meyer *et al.*, 2016

oder ADCP beeinflussen, indem bspw. die Affinität des Antikörpers zu aktivierenden FcR erhöht wird. Durch die Herstellung von sog. *low fucose*-Varianten (siehe auch Obinutuzumab, Handelsname Gazyva, Roche) von IgG1-Antikörpern wurde die NK-Zell vermittelte ADCC deutlich verbessert. Obwohl der Beitrag des Komplementsystems zur therapeutischen Aktivität monoklonaler Antikörper weiterhin umstritten ist, konnten auch hier Strategien des Proteinengineerings die induzierte CDC verbessern. (zusammengefasst in Kellner *et al.*) IgG Antikörper weisen durch die Bindung ihres Fc-Teils an den neonatalen FcR (FcRn) naturgemäß verhältnismäßig lange Serumretentionszeiten von bis

zu 21 Tagen auf (Morell *et al*, 1970). Während IgG Antikörper den neonatalen FcR FcRn pH-Wert abhängig am Übergang von CH2 zu CH3 ihres Fc-Teils binden (Roopenian & Akilesh, 2007), vermitteln IgA Antikörper mit ihrem Fc-Teil am Übergang CH2-CH3 die Bindung an FcαRI (Carayannopoulos *et al*, 1996). Besonders für Moleküle, die nicht über die Bindung an FcRn „recycelt“ werden, wurden in der Vergangenheit Strategien untersucht, die zur Verlängerung der Serumhalbwertszeit führen sollten. Dabei wurden verschiedene Ansätze wie z.B. PEGylierung, oder die Verknüpfung der Fragmente mit Proteinen wie Albumin oder mit einem IgG Fc-Teil zu einem Fc-Fusionsprotein entwickelt und *in vivo* untersucht (zusammengefasst in Nelson, 2010).

Auch für die Entwicklung eines stabilen, zuverlässigen und kontrollierbar zu produzierenden Antikörperformats im IgA-Hintergrund konnte das Konzept der Protein- und Glykooptimierung übertragen werden. Dabei stand besonders die Verlängerung der Retentionszeiten im Serum der Moleküle im Vordergrund. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten dabei unterschiedliche Strategien. So konnte die Kopplung einer albuminbindenden Domäne (ABD) an sowohl die schwere als auch die leichte Kette eines anti-HER2-IgA-Moleküls die *in vivo* Halbwertszeit als auch die Anwesenheit des Antikörpers im Serum signifikant im Vergleich zu einem ungekoppelten IgA-Vergleichsmolekül verlängern (siehe Abbildung 9) (Meyer *et al*, 2016). Während Antikörper der IgA2-Subklasse insgesamt acht Glykosylierungsstellen pro Molekül aufweisen, tragen IgA1-Antikörper natürlicherweise nur vier N-Glykosylierungsstellen. Bei der Entwicklung eines neuen IgA



**Abbildung 10: Das Konzept der Protein- und Glykooptimierung lässt sich erfolgreich auf IgA-Moleküle übertragen.** Um die Dimerisierung zweier IgA Antikörper zu verhindern wurde das sog. *tail piece* und gleichzeitig eine Bindungsstelle für die sekretorische Komponente in der konstanten Region des Antikörpers entfernt, um monomere Antikörperpräparationen zu erhalten. Für eine verbesserte Stabilität wurden schwere und leichte Ketten des Antikörpers mittels Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft. Während IgA2-Antikörper natürlicherweise vier N-Glykosylierungsstellen pro schwere Kette tragen, zeigen schwere Ketten von IgA1-Antikörpern nur zwei N-Glykosylierungsstellen. Sequenzmotive des IgA2-Moleküls wurden zugunsten der IgA1-Sequenz ausgetauscht um die Glykosylierung des optimierten Antikörperformats zu reduzieren (Lohse *et al*. 2016).

Antikörperformats wurde sich dieser Umstand zu Nutze gemacht, indem die Bereiche der Sequenz des IgA2-Moleküls, die entsprechende Erkennungssequenzen für die Verknüpfung von N-Glykanen tragen, durch die äquivalente IgA1-Sequenz ausgetauscht wurden (die an diesen Positionen keine Erkennungssequenzen tragen). Der daraus resultierende IgA2.0 Antikörper zeigte durch das

Entfernen der N-Glykosylierungsstellen an Position 166 und 337 eine signifikant reduzierte Glykosylierung des gesamten Moleküls (Lohse *et al*, 2016). Zudem trägt der IgA2.0-Antikörper einen höheren Grad an terminaler Sialylierung (IgA2.0 = 91% vs. IgA2wt = 46%). Dass zwischen N-Glykosylierung und Pharmakokinetik von IgA Antikörpern eine Verbindung besteht, konnte bereits im Jahr 2000 gezeigt werden. In der Studie zeigten verschiedene N-Glykan-Mutanten eines IgA1-Moleküls verlängerte Serumhalbwertszeiten in Mäusen als ein wt-Vergleichsmolekül (Rifai *et al*, 2000). Der Grund für die schnelle Eliminierung der IgA Antikörper aus dem Kreislauf ist die Bindung der Moleküle an den Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR), einem Rezeptor dessen biologische Aufgabe darin besteht, seneszente Blutplättchen aus dem Blutkreislauf zu binden und herauszufiltern, um somit die Thrombopoese zu regulieren (Hoffmeister & Falet, 2016). Der ASGPR wird hauptsächlich von Hepatozyten exprimiert und erkennt desialylierte Proteine, die endständige Galaktose- oder N-Acetylglucosaminreste tragen. Der Rezeptor internalisiert gebundene Moleküle über Clathrin-vermittelte Endozytose und die gebundenen Liganden werden anschließend lysosomal abgebaut (zusammengefasst in D'Souza & Devarajan, 2015). Wird die Bindung therapeutischer monoklonaler IgA Antikörper an den Rezeptor verhindert (z.B. durch Konkurrenz mit Asialofetuin), verbessert sich deren Serumhalbwertszeit in den ersten Stunden nach Injektion signifikant (Boross *et al*, 2013).

Obwohl die glykoengineerten IgA Antikörper eine Verbesserung ihrer Pharmakokinetik zeigten (Lohse *et al*, 2016), müssten für die klinische Nutzung eines IgA Antikörperformates wahrscheinlich mehrere unterschiedliche Strategien miteinander kombiniert werden, um mit einem IgG Antikörper vergleichbare Serumhalbwertszeiten zu erhalten. So könnte das IgA2.0 Molekül zusätzlich mit bereits in anderen Studien untersuchten Methoden, wie bspw. einer zusätzlich gekoppelten ABD (Meyer *et al*, 2016) oder aber der Kombination aus IgA/IgG-Molekül zu einem sog. "*cross-isotype*" (Kelton *et al*, 2014) weiterentwickelt werden.

Abgesehen von der Optimierung der Glykosylierung therapeutischer IgA Antikörper wurden in der Vergangenheit auch an anderen Stellen der Moleküle Veränderungen vorgenommen, um bspw. die Präparation monomerer Antikörper sicherzustellen. Die Dimerisierung zweier IgA-Moleküle spielt für die biologische Rolle dieser Antikörper im Immunsystem eine wesentliche Rolle (s.o. 1.3 Die Biologie humaner IgA Antikörper) und wird über einen freien Cysteinrest an Position 471 in deren sog. *tail piece*-Region vermittelt. Bereits 1996 konnte in Mutagenesestudien nachgewiesen werden, dass sowohl die komplette Deletion der *tail piece*-Region als auch nur der bloße Austausch des Cysteinrestes an Position 471 (Cystein zu Serin) zur Sekretion monomerer IgA-Moleküle führte (Atkin *et al*, 1996). Anschließend wurde in einer Studie der Arbeitsgruppe um Thomas Valerius eine Deletionsvariante eines gegen den EGFR gerichteten IgA2 Molekül hergestellt und sowohl biochemisch als auch funktionell mit dem wt-Molekül verglichen. Obwohl sich das anti-EGFR-IgA2-wt



d471 Molekül in seinen funktionellen Eigenschaften (Bindung an das Antigen, EGF-vermittelte Proliferationsinhibition, Effektorzellrekrutierung für ADCC) nicht vom Ausgangsmolekül unterschied, zeigten beide Moleküle deutliche Unterschiede in Bezug auf ihre biochemischen Charakteristika. Die IgA Antikörper, die die *tail piece*-Deletion trugen, zeigten sowohl in An- als auch in Abwesenheit der *J-chain* einen reduzierten Grad an Dimerisierung (Brunke *et al*, 2013).

Zusätzlich zur Reduktion von N-Glykosylierungsstellen und *tail-piece*-Deletion wurde die DNA-Sequenz des IgA2.0-Antikörpers so verändert, dass Disulfidbrücken zukünftig schwere und leichte Kette kovalent miteinander verknüpfen. Nach der Transkription und Translation der mutierten DNA-Sequenz erhöhte der Aminosäureaustausch (von Prolin zu Arginin) an Position 221 und die damit verbundene veränderte Anordnung der Disulfidbrücken die Stabilität des gesamten Moleküls (Lohse *et al*, 2016). Während die Optimierungsstrategien Faktoren wie Stabilität des Antikörpers, Pharmakokinetik oder die Verringerung des Grades der Aggregation (Dimierisierung oder Verklumpung mit Serumproteinen) stark beeinflussten, zeigten sich in Bezug auf Fab- und Fc-vermittelte Effektormechanismen keine Unterschiede zwischen IgA2.0 und IgA2wt-Molekülen. Die Verknüpfung unterschiedlicher variabler Domänen mit dem IgA2.0-Molekül kann somit ein interessantes Werkzeug sein, um den therapeutischen Effekt dieser neu-generierten Moleküle auf die Wirksamkeit von Erkrankungen verschiedener Entitäten zu untersuchen.

## 1.8 Eigene Vorarbeiten

### 1.8.1 Aktivierung von PMN als Effektorzellen für ADCC durch einen CD20-IgA2 Antikörper

In eigenen Vorarbeiten wurde ein IgA2wt Antikörper generiert, der die variablen Regionen des murinen 1F5 CD20 Antikörpers trug. Die kodierenden DNA-Sequenzen für die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten wurden im Zuge einer Kollaboration aus dem Hybridom des murinen 1F5-IgG2a kloniert (Cragg *et al*, 2003). Die Sequenz für die variable Region der schweren Kette wurde daraufhin in Expressionsvektoren (pNUT) ligiert und so mit entweder den konstanten Regionen der schweren Kette eines IgA2wt oder denen eines IgG1 Antikörpers kombiniert. Eine Sequenz für die humane kappa-Leichtkette wurde mit den klonierten variablen Regionen der leichten Kette des 1F5 Hybridoms kombiniert. Entsprechende Expressionsvektoren der leichten und schweren Ketten wurden anschließend in *baby hamster kidney* (engl. BHK) Zellen co-transfiziert, um antikörperproduzierende Zellklone zu erhalten. Antikörper der Zellkulturüberstände wurden zunächst per Affinitätschromatographie und später zusätzlich per Größenausschlußchromatographie gereinigt. Die monomeren 1F5-IgA2wt und 1F5-IgG1 Antikörperpräparationen wurden anschließend sowohl biochemisch als auch funktionell charakterisiert. Dabei banden beide Antikörper gleich effizient CHO-K1 Zellen, die stabil mit einem Expressionsvektor für humanes CD20 transfiziert waren

(pcDNA3.1 hu CD20, nicht veröffentlicht, Matthias Peipp, siehe auch (Lohse *et al*, 2017; Wirt *et al*, 2017). Während der 1F5-IgG1 Antikörper in ADCC Versuchen effektiv mononukleäre Zellen (mononuclear cells, MNC = peripheral blood mononuclear cell, PBMC) als Effektorzellen sowohl gegen Ramos Zellen als auch frisch-präparierte CLL-Zellen von Patienten aktivieren konnte, war das 1F5-IgA2wt Molekül äußerst effektiv in der Rekrutierung von stimulierten PMN als Effektorzellen in <sup>51</sup>Chromfreisetzungsversuchen. Wurden Monozyten oder Makrophagen in ADCC-Versuchen als Effektoren eingesetzt, konnten beide 1F5-Antikörperformate ähnliche Lyseraten erzielen.

### 1.8.2 Aktivierung des Komplementsystems zur Tumorzelllyse durch IgA Antikörper

Während klassische Komplementaktivierung für IgG1 Antikörper beschrieben ist, besitzen IgA Antikörper keine Bindestelle für das Initiationsmolekül der klassischen Komplementkaskade C1q in ihrem Fc-Teil. Interessanterweise wies eine Arbeitsgruppe in einer Studie aus dem Jahr 2012 effiziente CDC verschiedener Tumorzelllinien nach, die durch einen CD20-gerichteten IgA Antikörper vermittelt wurde (Pascal *et al*, 2012). Neben dem klassischen Weg sind noch zwei weitere Wege der Komplementaktivierung (alternativer- und Lektinweg) beschrieben, die sich in ihren Initiationsmechanismen sowie der Bildung der Konvertasen unterscheiden. Zentraler Mechanismus aller komplementvermittelten Effekte ist die proteolytische Spaltung der Komplementkomponente C3. Die Entstehung der Konvertasen, die diese Spaltung katalysieren, unterscheidet sich zwischen den drei Komplementwegen, löst aber in jedem Fall eine Kaskade aus, in deren Konsequenz entweder die Bildung des MAC die Rekrutierung von Effektorzellen oder/und die Opsonisierung der Zellen erfolgt. Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems und dient dabei der Erkennung und Eliminierung von pathogenen Mikroorganismen und maligner oder apoptotischer Zellen. Während C1q, das Initiationsmolekül der klassischen Kaskade von Antikörpern wie IgG und IgM gebunden wird, erkennen Initiationsmoleküle des Lektinweges (mannosebindendes Lektin (MBL) oder Ficoline) bestimmte Zuckerstrukturen auf pathogenen Zelloberflächen. Klassische und MBL-abhängige Komplementaktivierung unterscheiden sich zwar in der Art ihrer Initiation, die Schritte der nachfolgenden Kaskade teilen sich jedoch beide Wege. Anders als der klassische Komplementweg und Lektinweg wird der alternative Komplementweg nicht über Initiationsmoleküle ausgelöst. Die spontane Hydrolyse der Komplementkomponente C3 durch eine lösliche C3-Konvertase führt zu einer Fixierung entstandener Spaltprodukte auf bspw. pathogenen Zelloberflächen. Diese Fixierung vermittelt das Loslaufen der alternativen Komplementkaskade, die über aktivierende oder inhibierende Mechanismen reguliert werden und ebenfalls zur Lyse der gebundenen Zellen führen kann.

Obwohl das Fehlen einer C1q-Bindestelle im F-Teil des 1F5-IgA2wt Antikörpers eine mit einem IgG1-Antikörper vergleichbare klassische Komplementaktivierung unmöglich macht, konnten beide

Antikörperformate vergleichbar effizient CDC verschiedener Zelllinien und frisch-präparierter primärer CLL Zellen vermitteln (Lohse *et al.*, 2017). Verschiedene Versuchsbedingungen wie Temperatur- und Zeitabhängigkeit sowie die Abhängigkeit der Lyse von der eingesetzten Serumkonzentration legten eine alternative Komplementaktivierung durch den IgA2wt Antikörper nahe. Sowohl die Arbeitsgruppe um Pascal *et al.* als auch unsere Arbeit mit dem 1F5-IgA2wt Molekül konnte eine Beteiligung des alternativen Weges der induzierten CDC nachweisen. Während für das von uns untersuchte 1F5-IgA2wt Molekül im ELISA keine C1q-Bindung nachgewiesen werden konnte, zeigte das von Pascal *et al.* untersuchte CD20-IgA Molekül in Bindungsexperimenten an CD20<sup>pos</sup> Tumorzellen eine CD20-IgA vermittelte, zeitlich verzögerte Anlagerung von C1q (Pascal *et al.*, 2012). Die Autoren schlussfolgerten, dass die Anlagerung von C1q an die Tumorzellen als ein sekundäres Ereignis auftrat, nachdem die CD20-gerichteten Antikörper direkte Apoptose der Zielzellen induzierten. Im Jahr 2016 stellte die Arbeitsgruppe um Engelberts *et al.* das Konzept des akzessorischen CDC vor (Engelberts *et al.*, 2016). Hier waren F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente mehrerer Typ I CD20 gerichteter Antikörper in der Lage, C1q-abhängig CDC verschiedener Zelllinien und primärer Tumorzellen in Anwesenheit eines BCR zu vermitteln. Die Autoren erstellten die Hypothese, dass es durch die Bindung der Antikörper (oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente) an ihr Antigen zu einer Umstrukturierung von CD20 und anderen Molekülen wie dem BCR in der B-Zell-Membran in *lipid rafts* kommt. Der BCR kann schließlich als Plattform für C1q dienen und eine vom Fc-Teil des CD20-Antikörpers unabhängige komplement-abhängige Zytotoxizität der Zielzellen induzieren. Auch für den von uns untersuchten 1F5-IgA2wt als auch das CD20-gerichtete IgA-Molekül von Pascal *et al.* wäre eine solch indirekte, C1q-abhängige Komplementinduktion denkbar.

### 1.9 Hypothesen & Ziele

Polymorphnukleäre Zellen stellen die zahlenmäßig größte myeloische Effektorzellpopulation im Blut des Menschen dar. In der Vergangenheit konnten therapeutische IgA Antikörper sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen entwickelt und untersucht werden. Durch die Etablierung von Protokollen zur Protein- und Glykootimierung von IgA Antikörpern können stabilere und besser kontrollierbare Moleküle produziert werden, die sich in Bezug auf deren Pharmakokinetik, Stabilität und Produktivität von Wildtyp-IgA-Molekülen unterscheiden. Für die vorliegende Arbeit wurden aufgrund eigener Vorarbeiten folgende Hypothesen definiert:

- Die Generierung optimierter IgA-Moleküle steigert deren Stabilität, Produzierbarkeit und Pharmakokinetik.

- Die Eigenschaften der Antigenbindung der generierten IgA-Moleküle hängt von deren variablen Region ab.
- Die Verbindung variabler Regionen bereits zugelassener CD20-gerichteter Antikörper mit konstanten Regionen optimierter IgA2 Antikörper hat einen Einfluss auf die von den Antikörpern induzierten Effekte auf Zielzellen und lässt sich vergleichend zu der Typ I/Typ II-Charakteristik von CD20-gerichteten IgG1-Antikörpern einteilen.
- CD20-gerichtete Antikörper können aufgrund ihrer Bindung an Fc $\alpha$ RI effizient PMN zur Lyse von CD20<sup>pos</sup> Tumorzellen rekrutieren.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Herstellung CD20-gerichteter, optimierter IgA-Moleküle, die die variablen Regionen von Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab tragen.
2. Die durch die IgA Antikörper vermittelten direkten und indirekten Wirkmechanismen sollen vergleichend zu den durch die parentalen IgG1-Antikörper induzierten Effekte untersucht werden.
3. Anhand der von CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörpern vermittelten Wirkmechanismen soll eine Einteilung der Moleküle nach einer für IgG1 Antikörper bestehenden Typ I/Typ II-Charakteristik erfolgen.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Ethikvotum und Einverständnis der Spender

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki begutachtet. Die Blutspender wurden zufällig aus einer Gruppe gesunder Freiwilliger ausgewählt. Alle Spender gaben ihr schriftliches Einverständnis jeweils vor der Untersuchung.

### 2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Um die Expressionsvektoren der verschiedenen CD20 gerichteten IgA Antikörper zu konstruieren, wurden die DNA-Sequenzen der variablen Regionen der jeweiligen Antikörper aus den Patentschriften entnommen (Rituximab: Anderson *et al*, Ofatumumab: Baadsgaard *et al*, 20 und Obinutuzumab: Umana *et al*, 2011), in Auftragssynthese hergestellt (Eurofins Scientific SE, Luxemburg, LU) und in einen Zwischenvektor von der Firma (pEX-A2) subkloniert. Die für Rituximabkonstrukte verwendete *leader*-Sequenz entspricht der im Patent angegebenen Sequenz. Für Ofatumumab und Obinutuzumab wurde jeweils eine *leader*-Sequenz gewählt, die den Sequenzen der Keimbahn der Antikörper bestmöglich entsprechen, um die fehlerfreie Abspaltung des Signalpeptides und die komplikationslose Sekretion der hergestellten Antikörper zu garantieren (The international immunogenetics information system®, 1995). Die Produktion monoklonaler IgA Antikörper mit Hilfe des GS Gene Expression System™ von Lonza (Lonza Group AG, Basel, CH) war zum Zeitpunkt des Projektbeginns bereits im Labor etabliert. Dazugehörige Expressionsvektoren (hier pEE14.4), die im Zuge eines anderen Projektes konstruiert wurden, konnten demnach als Basis für alle folgenden Konstrukte dienen. Durch den Austausch der kodierenden Sequenzen der variablen Regionen wurden sowohl der Vektor der leichten als auch der Vektor der schweren Kette kloniert. In Tabelle 1 sind alle für dieses Projekt benötigten Expressionsplasmide aufgeführt.

**Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der in der Arbeit verwendeten Ausgangs-, Zwischen- und Expressionvektoren.**

Ausgangsvektor	Zwischenvektor (Eurofins)	Expressionsvektor
pEE14.4-225-VH-IgA2.0-CH	pEX-A2 RTX-VH	pEE14.4-RTX-VH-IgA2.0-CH
	pEX-A2 Ofa-VH	pEE14.4-Ofa-VH-IgA2.0-CH
	pEX-A2 Obi-VH	pEE14.4-Obi-VH-IgA2.0-CH
	pEX-A2 RTX-VL	pEE14.4-RTX-VL-human kappa

pEE14.4-225-VL-human kappa	pEX-A2 Ofa-VL	pEE14.4-Ofa-VL-human kappa
	pEX-A2 Obi-VL	pEE14.4-Obi-VL-human kappa

### 2.2.2 Restriktionsverdau

Der Austausch der variablen Regionen der leichten Ketten erfolgte durch einen Restriktionsverdau der jeweiligen Vektoren mit den Enzymen HindIII-HF und NotI-HF (beide von New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Die Klonierung der Vektoren der schweren Ketten hingegen erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen HindIII-HF und BstEII-HF (beide von New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Die Ansätze der jeweiligen Restriktionsverdau setzten sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 2: Ansatz eines Restriktionsverdaus für das Erstellen eines Expressionsvektors der schweren Kette** (hier: exemplarisch für Ofatumumab-VH gezeigt)

Volumen/Menge	Variable Region/Insert	Volumen/Menge	Variable Region/Insert
10 µg	pEX-A2 Ofa-VH	2 µg	pEE14.4-225-VH-IgA2.0-CH
2 µL	CutSmart® Buffer (10x)	2 µL	CutSmart® Buffer (10x)
1 µL	HindIII-HF	1 µL	HindIII-HF
1 µL	BstEII-HF	1 µL	BstEII-HF
__µL	UltraPure™Water	__µL	UltraPure™Water
Σ 20 µL	Gesamtreaktionsvolumen	Σ 20 µL	Gesamtreaktionsvolumen

**Tabelle 3: Ansatz eines Restriktionsverdaus für das Erstellen eines Expressionsvektors der leichten Kette** (hier: exemplarisch für Ofatumumab-VL-humane κ Kette gezeigt)

Volumen/Menge	Variable Region/Insert	Volumen/Menge	Variable Region/Insert
10 µg	pEX-A2 Ofa-VL	2 µg	pEE14.4-225-VL-human kappa
2 µL	CutSmart® Buffer (10x)	2 µL	CutSmart® Buffer (10x)
1 µL	HindIII-HF	1 µL	HindIII-HF
1 µL	BstEII-HF	1 µL	BstEII-HF
__µL	UltraPure™Water	__µL	UltraPure™Water
Σ 20µL	Gesamtreaktionsvolumen	Σ 20µL	Gesamtreaktionsvolumen

Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert, mit ca. 75 µL Mineralöl (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) überschichtet und anschließend über Nacht in einem Wasserbad (Mettler, Schwabach, D) bei 37°C inkubiert. Die verdauten Reaktionsansätze wurden anschließend elektrophoretisch in einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

### 2.2.3 Gelelektrophorese

Um ein präparatives 1% (w/v) Agarosegel zu gießen, wurde 1 g SeaKem LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D) mit 100 mL 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat + 1 mM EDTA) in einer Mikrowelle aufgekocht und nach dem vollständigen Auflösen der Agarose in einen Gelgießstand (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) gegossen. Nach dem Auskühlen wurde das Agarosegel in eine Elektrophoresekammer (Wide Mini-Sub® Cell GT Cell, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) überführt, die aufzutrennenden Proben mit einer entsprechenden Menge Gelladepuffer (Roti®-Load DNA (mit Glycerin) 6x, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) versetzt und die Taschen nach Protokoll entweder mit einer DNA-Leiter (SmartLadder, Eurogentec, Seraing, Liège, BE) oder den entsprechenden Reaktionsansätzen beladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und die Laufweite der Proben nach ca. 40min überprüft. Nach der vollständigen Separation der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel für 15 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5% v/v Ethidiumbromid, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D in 1xTAE-Puffer) inkubiert. Separierte DNA-Fragmente wurden so unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert (E.A.S.Y® Doc plus, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, D) und mit einem sterilen Skalpell (FEATHER disposable scalpel #10, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) aus dem Gel ausgeschnitten.

### 2.2.4 Gelextraktion, Ligation und Transformation

**Tabelle 4: Ansatz der Ligation für das Erstellen eines Expressionsvektors der leichten Kette** (hier: exemplarisch für Ofatumumab-VL-human kappa Kette gezeigt)

Volumen	Ligation	Volumen	Autoligation
10 µL	Ofa-VL (geschnittenen und aufgereinigtes Insert)	— µL	
5 µL	UltraPure™Water	15 µL	UltraPure™Water
2 µL	pEE14.4-human kappa (geschnittener und aufgereinigter Vektor)	2 µL	pEE14.4-human kappa (geschnittener und aufgereinigter Vektor)
1 µL	T4 DNA Ligase (1 U/µL)	1 µL	T4 DNA Ligase (1 U/µL)
2 µL	T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 µL	T4 DNA Ligase Buffer (10X)
Σ 20µL	Gesamtreaktionsvolumen	Σ 20µL	Gesamtreaktionsvolumen

Alle ausgeschnittenen Gelstücke wurden gewogen und die enthaltene DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (250) (QIAGEN N.V., Venlo, NL) nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert. Im letzten Schritt der Präparation wurde die DNA mit 30 µL UltraPure™Water (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) von der Säule eluiert. Die durch Restriktionsverdau ausgeschnittenen variablen Regionen der parentalen CD20 gerichteten IgG1 Antikörper wurden im nächsten Schritt in die

jeweiligen ebenfalls geschnittenen Expressionsplasmide ligiert. Dabei wird für das Leichtkettenplasmid jeweils die variable Region der leichten Kette (VL) mit einem Expressionsplasmid der die DNA der humanen  $\kappa$  Kette trägt kombiniert. Der Expressionsvektor, der für die schwere Kette kodiert, setzt sich aus der variable Region der schweren Kette (VH) und der kodierenden Information der IgA2.0-CH (*Chain Heavy*) zusammen. Alle Ansätze der Ligations- und Autoligationsreaktionen wurden nach einem bestimmten Schema pipettiert (Tabelle 4 und Tabelle 5)

**Tabelle 5: Ansatz der Ligation für das Erstellen eines Expressionsvektors der schweren Kette** (hier: exemplarisch für Ofatumumab-VH-IgA2.0-CH Kette gezeigt)

Volumen	Ligation	Volumen	Autoligation
<b>10 <math>\mu</math>L</b>	Ofa-VH (geschnittenes und gereinigtes Insert)	<b><math>\mu</math>L</b>	
<b>5 <math>\mu</math>L</b>	UltraPure™Water	<b>15 <math>\mu</math>L</b>	UltraPure™Water
<b>2 <math>\mu</math>L</b>	pEE14.4-IgA2.0-CH (geschnittener und gereinigter Vektor)	<b>2 <math>\mu</math>L</b>	pEE14.4-IgA2.0-CH (geschnittener und gereinigter Vektor)
<b>1 <math>\mu</math>L</b>	T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ L)	<b>1 <math>\mu</math>L</b>	T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ L)
<b>2 <math>\mu</math>L</b>	T4 DNA Ligase Buffer (10X)	<b>2 <math>\mu</math>L</b>	T4 DNA Ligase Buffer (10X)
<b><math>\Sigma</math> 20<math>\mu</math>L</b>	<b>Gesamtreaktionsvolumen</b>	<b><math>\Sigma</math> 20<math>\mu</math>L</b>	<b>Gesamtreaktionsvolumen</b>

und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ligationsansätze am nächsten Tag in chemisch- kompetente *Escherichia coli* Bakterien (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* oder One Shot® Mach1™-T1R Chemically Competent *E. coli*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) transformiert. Die *E.coli* Zellen wurden nach Herstellerangaben transformiert und anschließend mit sterilen Plattierungsspateln (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) auf 2xYT<sub>Amp</sub>-Platten (10 mg/mL Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator (Heraeus® Function Line B12, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) kultiviert. Es wurden je zwischen 10 und 30 Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen (Biosphere® Filter Tip, 200 $\mu$ L farblos) gepickt und in ein steriles, mit 2xYT<sub>Amp</sub>-Medium (10 mg/mL Ampicillin) befülltes Falconröhrchen (Röhre 15 ml, mit Schraubdeckel, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) überführt. Nach einer Inkubationszeit in einem Schüttelinkubator bei 37°C wurden die Bakteriensuspension durch Zentrifugation geerntet und die Plasmidpräparation (NucleoSpin® Plasmid, MACHEREY-NAGEL GmbH und Co. KG, Düren, D) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.5 Sequenzierung

Die Richtigkeit der Plamidpräparationen wurde zunächst durch einen Kontrollrestriktionsverdau und anschließend durch Sanger-Sequenzierung verifiziert. Für die Sequenzierung wurden alle



Plasmidpräparationen mit spezifischen Sequenzierprimern versehen und anschließend an das Institut für Klinische Molekularbiologie IKMB (Zentrum für Biowissenschaften, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, D) versandt.

### **2.2.6 Präparation endotoxinfreier DNA und deren photometrische Konzentrationsbestimmung**

Nachdem die Richtigkeit der inserierten DNA-Fragmente durch Sequenzierung bestätigt wurde, erfolgte erneut deren Vervielfältigung mithilfe einer transformierten *E.coli* Übernachtskultur (s.o.). Dafür wurden 250 mL des 2xYT-Mediums mit 10 mg/mL eines Selektionsantibiotikums (hier Ampicillin Natriumsalz, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) versetzt und Bakterien, die die spezifische Plasmid-DNA der Antikörperkonstrukte tragen, über Nacht bei 37°C in einem Erlenmeyerkolben (DURAN® Erlenmeyerkolben, DURAN Group GmbH, Wertheim, D) unter konstantem Schütteln (200 U/min) vermehrt. Nachdem die Bakterienkultur durch Zentrifugation geerntet wurde, konnte die enthaltene Plasmid-DNA endotoxinfrei mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits (QIAGEN N.V., Venlo, NL) nach Herstellerangaben präpariert werden. Die DNA wurde mit 500 µL UltraPure™ Water in ein steriles Reagiergefäß (SafeSeal Reagiergefäß, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) eluiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Küvette (UV-transparente Einmal-Küvetten, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) die Konzentration der präparierten Plasmid-DNA photometrisch (BioPhotometer Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg, D) bei 260 nm bestimmt.

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Zellkultur**

Als Bezugsquelle der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (aufgeführt siehe Tabelle 6) diente entweder das Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, D) oder die *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA). Alle Zelllinien (Tabelle 6) wurden in sterilen Zellkulturflaschen (TC-Flasche, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) bei konstanten Temperatur- (37°C) und CO<sub>2</sub>-Bedingungen (5%) in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren (Heracell®240 & Heracell®150, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) kultiviert. Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Kulturmedien mit 1% v/v Pen Strep (Penicillin-Streptomycin, 10,000 U/mL, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) versetzt. Adhärent wachsende Zelllinien wurden mit 0,05% v/v Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) aus den TC-Flaschen gelöst, anschließend in Zellkulturmedium gewaschen und in gewünschter Zellzahl ausgesät.

**Tabelle 6: Übersicht über Zelltyp, Herkunft, Erstbeschreibung, Bezugsquelle, Kulturmedium und Kultivierungsbedingungen der in der Arbeit verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Zelltyp	Medium	Kultivierung	Quelle
<b>BHK-CD89<sup>+</sup></b>	<i>Baby Hamster Kidney</i> Zellen transfiziert mit humanem CD89 und einem Plasmid der für FcεR1y kodiert	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FKS +500 µg/ml Geneticin+10µM Methotrexat	1:5 bis 1:10 Alle 2-3 Tage	(Dechant <i>et al</i> , 2007)
<b>CARNAVAL</b>	Diffus großzelliges B-Zell- Lymphom (DLBCL)	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FKS	0,5x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ -
<b>CHO-K1</b>	Zelllinie aus den Ovarien der chinesischen Hamster- art <i>Cricetulus griseus</i>	90% DMEM + 10% h.i. FKS	1:5 bis 1:10 Alle 2-3 Tage	Lonza (Puck <i>et al</i> , 1958)
<b>CHO-K1 CD20<sup>+</sup></b>	s.o. Zellen transfiziert mit humanem CD20	90% DMEM + 10% h.i. FKS + 500 µg/mL Hygromycin B	1:5 bis 1:10 Alle 2-3 Tage	(Lohse <i>et al</i> , 2017; Wirt <i>et al</i> , 2017)
<b>Daudi</b>	Burkitt-Lymphom	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FKS	0,4x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Klein <i>et al</i> , 1968)
<b>GRANTA-519</b>	B-Zell-Lymphom (B-NHL leukemic transformation of MCL) stage IV	90% DMEM + 10% h.i. FKS	0,5x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Jadayel <i>et al</i> , 1997)
<b>Mec-2</b>	chronische B-Zell Leukämie (CLL)	90% IMDM + 10% h.i. FKS	0,3x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Stacchini <i>et al</i> , 1999)
<b>MINO</b>	B-Zell-Lymphom (MCL)	80% RPMI 1640 + 20% h.i. FKS	0,5x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Lai <i>et al</i> , 2002)
<b>Oci-Ly3</b>	B-Zell-Lymphom (B-NHL, DLBCL), stage 4B	80% RPMI 1640 + 20% h.i. FKS	0,2x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Tweeddale <i>et al</i> , 1987)
<b>Oci-Ly7</b>	B-Zell-Lymphom (B-NHL, DLBCL), stage 2A	85% IMDM + 15% h.i. FKS	0,5x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ Tweeddale, 1987
<b>Oci-Ly18</b>	Diffus großzelliges B-Zell- Lymphom (DLBCL), stage 3B	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FKS	0,5x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Chang <i>et al</i> ,

1992)				
<b>Ramos</b>	Burkitt-Lymphom	80% RPMI 1640 + 20% h.i. FKS	0,5x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Klein <i>et al</i> , 1975)
<b>RC-K8</b>	B-Zell-Lymphom (B-NHL, DLBCL)	85% RPMI 1640 + 15% h.i. FKS	0,8x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Kubonishi <i>et al</i> , 1985)
<b>SU-DHL4</b>	B-NHL (diffuse large cell, cleaved cell type)	85% RPMI 1640 + 15% h.i. FKS	0,5x10 <sup>6</sup> /mL Alle 2-3 Tage	DSMZ (Epstein <i>et al</i> , 1976)

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken Herasafe™ (HS oder KS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und mit sterilem Verbrauchsmaterial durchgeführt. Die Zellen wurden zwei bis dreimal wöchentlich zuerst unter einem Inversmikroskop (Axiovert 40C, Zeiss, Oberkochen, D) optisch begutachtet und deren Vitalität und Zellzahl mit Hilfe einer Tryptan-Blau-Färbung bestimmt. Dazu wurden aus den TC-Flaschen je 10 µL der Zellsuspension entnommen und mit 40 µL einer Tryptan-Blau-Lösung (Trypan Blue solution, 0.4%, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) vermischt. Die gefärbten Zellen (10 µL) konnten schließlich in einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer-improved, Kammertiefe 0,1 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) unter einem Mikroskop (Axiostar Plus, Zeiss, Oberkochen, D) gezählt und deren Vitalität berechnet werden. Gemäß der Angaben der DSMZ wurden die Zellen anschließend mit frischem Zellkulturmedium (siehe Tabelle 6) in der angegebenen Zellzahl/mL wieder in neue TC-Flaschen ausgesät. Sämtliche Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf die Kontamination mit Mykoplasmen (MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit, Lonza Group AG, Basel, CH) untersucht und kontaminierte Zelllinien bei Bedarf verworfen und neu aufgetaut oder mit Plasmocin (Plasmocin™ - Mycoplasma Elimination Reagent, InvivoGen, San Diego, CA, USA) behandelt.

### 2.3.2 Produktion monoklonaler IgA Antikörper

#### 2.3.2.1 Herstellung stabiler CHO-K1 Klone für die Antikörperproduktion

Die Produktion monoklonaler IgA Antikörper in stabilen CHO-K1 Linien war zu Beginn dieser Arbeit bereits im Labor etabliert. Am ersten Versuchstag wurden die CHO-K1 Zellen gezählt. Anschließend wurden 1,5x10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm TC-Schale (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) in 10 mL DMEM ohne L-Glutamin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ausgesät. Dem Zellkulturmedium wird dabei zwar FKS (dialysiert, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), aber kein Pen Strep zugesetzt. Durch die erhöhte Zellpermeabilität während der Lipofektion besteht bei Anwesenheit von Antibiotika während der Transfektion ein Risiko für Zytotoxizität, was im

Anschluss zu einer geringeren Transfektionseffizienz führen kann. An Tag 2 erfolgt die Transfektion der Expressionsvektoren in die vorbereiteten CHO-K1 Zellen mittels Lipofektion. Dabei wurden zu transfizierende DNA und Lipofectamine (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) jeweils getrennt voneinander angesetzt (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7: Transfektionsansatz für die Lipofektion der pEE14.4-Expressionsplasmide mit CHO-K1 Zellen für die Generierung stabiler antikörperproduzierender Zelllinien**

Volumen/ Menge	DNA-Ansatz	Volumen	Lipofectamine-Ansatz
12 µg	pEE14.4-RTX-VH-IgA2.0-CH	30 µL	Lipofectamine® 2000
12 µg	PEE14.4-RTX-VL-human κ		
1,5 mL	Opti-MEM®	1,5 mL	Opti-MEM®
Σ 1,5 mL	Gesamtreaktionsvolumen	Σ 20 µL	Gesamtreaktionsvolumen

Nach einer 10minütigen Inkubationszeit wurden beide Ansätze miteinander vermischt und anschließend erneut 20 Minuten inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise auf den jeweiligen 10 cm TC-Platten/CHO-K1 Zellen verteilt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein Kontrollplasmid bei gleichen Bedingungen transfiziert, das die DNA-Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins enthält (maxGFP™, Lonza Group AG, Basel, CH). Der Wechsel vom Transfektions- auf das Selektionsmedium (Tabelle 8) fand an Tag 3 statt. Die GFP-kontrolltransfizierten Zellen konnten 48 h nach der Transfektion durchflusszytometrisch untersucht werden.

**Tabelle 8: Zusammensetzung des Selektionsmediums für die Generierung stabiler antikörperproduzierender Zelllinien**

Volumen/ Menge	Selektionmedium
500 mL	DMEM ohne L-Glutamin
10% v/v	dialysiertes FKS
1% v/v	Pen Strep (10,000 U/mL)
1% v/v	NEAA (100X)
6 µg/ml	L-Glutamat
6 µg/ml	L-Asparagin
7 µg/ml	Guanosin/Cytidin/Uridin/Thymidin
50 µM	MSX

Alle transfizierten CHO-K1 Zellen wurden anschließend für ca. 6 Wochen im Brutschrank kultiviert und das Medium zwei bis dreimal pro Woche gewechselt. Einzelklone wurden mithilfe einer Pipette unter dem Inversmikroskop aus den 10 cm-TC-Schalen in eine 96 well TC-Platte überführt.

Anwachsende Klone wurden mittels ELISA auf die Produktion monoklonaler IgA Antikörper untersucht. Klone mit den besten Produktionsraten wurden für die präparative Antikörperherstellung weiterhin in größeren Maßstäben kultiviert. Alle verwendeten CD20 Antikörper (Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab) oder Isotypkontrollantikörper (wie bspw. Cetuximab), die bereits eine Zulassung für die klinische Anwendung haben, wurden über die Apotheke des UKSH Kiel bezogen.

#### **2.3.2.2 Transiente Antikörperproduktion in HEK FreeStyle™ 293-F Zellen**

Alle transienten Transfektionen wurden im Labor für Immuntherapie/Labor für translationale Immunologie des University Medical Centers Utrecht in den Niederlanden durchgeführt und die aufgereinigten Antikörperproben anschließend in PBS verdünnt verschickt. Die Transfektion wurde wie in (Meyer *et al*, 2016, 2) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden von unseren Kooperationspartnern HEK FreeStyle™ 293-F Zellen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) nach dem Auftauen in GIBCO® FreeStyle™ 293 Expression Medium bis zu einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL kultiviert und anschließend  $3 \times 10^5$  viable Zellen pro mL Medium ausgesät. Zellen wurden mit der Zellkultur gesplittet und dabei mit einer Dichte von  $3-5 \times 10^5$  Zellen/mL weitergeführt. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen (mit einer Viabilität von  $< 90\%$ ) mit einer Dichte von  $2,2 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 2 mL in eine 6-well-Platte ausgesät und in einem Orbitalschüttler bei  $8\%$  CO<sub>2</sub> und 125 rpm inkubiert. Die DNA kodierend für die schwere Kette, die leichte Kette und des pAdvantage™ Vectors (Promega, Fitchburg, WI, USA) wurden in Opti-MEM® verdünnt (insgesamt 2 µg DNA/mL Transfektionsansatz). In einem zweiten separaten Ansatz wurde das Transfectionsreagenz 293fectin™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ebenfalls in Opti-MEM® verdünnt anschließend vorsichtig vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Der DNA-Mix wird dem 293fectin™-Mix hinzugefügt (293fectin™: DNA-Verhältnis = 1,33), vermischt und anschließend für 20-30 min inkubiert. Der komplette Transfektionsmix wird anschließend tropfenweise zu den Zellen in der 6-well-Platte hinzupipettiert. Antikörper in Zellkulturüberständen konnten nach 4 Tagen geerntet werden.

#### **2.3.3 Durchflusszytometrie**

Alle durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit wurden entweder an einem EPICS® XL™ oder an einem NAVIOS™ Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) durchgeführt. Jede Messprobe wurde mit mindestens  $1 \times 10^4$  Events analysiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Waschschrte mit FACS-Puffer durchgeführt (1x DPBS + 1% w/v BSA + 0,1% v/v Natriumazid). Die Auswertung der Daten fand mit der Software Kaluza von Beckman Coulter statt.

### **2.3.3.1 Expression des Oberflächenantigens CD20 auf humanen Tumor- und transgenen Hamsterzelllinien**

Von jeder Zelllinie wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und zunächst mit 200 µg/well normalem Immunglobulin vom Menschen (Intratect, Biotest AG, Dreieich, D) für 15min auf Eis inkubiert. Der direkt gekoppelte CD20-Fluoresceinisothiocyanat (kurz: FITC) oder ein IgG(mouse)-FITC Kontrollantikörper (beide Beckman Coulter, Brea, CA, USA) wurden in die jeweiligen wells pipettiert (10 µL pro Test) und die Ansätze anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend in FACS-Röhrchen überführt und am NAVIOS™ Flow Cytometer analysiert.

### **2.3.3.2 Nachweis der spezifischen Antigenbindung**

Für den Nachweis der spezifischen Antigenbindung der produzierten IgA Antikörper wurden zunächst  $2 \times 10^5$  CD20 exprimierende CHO-K1 Zellen pro well in eine Mikrottestplatte (96 well, K Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) überführt und anschließend mit 50µL einer entsprechenden Verdünnung (100-0,032µg/mL) der zu untersuchenden IgA Antikörper und entsprechender Kontrollantikörper auf Eis für 1h inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen wurden alle Ansätze mit einem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (Goat Anti Human-Kappa-FITC; SouthernBiotec, Birmingham, AL, USA) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Letztendlich wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und anschließend in FACS-Röhrchen überführt und am EPICS® XL™ Durchflussszytometer analysiert.

### **2.3.3.3 Homotypische Aggregation**

Die jeweiligen Zielzelllinien wurden am Tag des Experimentes gezählt und anschließend auf eine Konzentration von  $0,7 \times 10^6$ /mL Zellkulturmedium eingestellt. In eine 96 well TC-Platte (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) wurden anschließend 200 µL der eingestellten Zellsuspension auf eine entsprechende Anzahl der wells verteilt. Inhibitoren wie Latrunculin B (LatB, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) oder der Caspase Inhibitor Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-Methyl]-Fluoromethylketon (kurz: Z-VAD-FMK; ApexBio Technology, Houston, TX, USA) wurden in entsprechenden Endkonzentrationen (Lat B = 10 µM bzw. Z-VAD-FMK = 50 µM) jeweils entweder eine halbe Stunde (Lat B) oder eine Stunde (Z-VAD-FMK) vor der Antikörpergabe zu den Zellen pipettiert. Zu analysierende CD20 gerichtete- und Kontrollantikörper (IgA und IgG1) wurden in angegebener Konzentration (10µg/mL) zu den einzelnen wells hinzugegeben und die TC-Platte für 4h oder 24h im Brutschrank bei konstanten Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Bedingungen (37°C/ 5%) inkubiert. Die Zellen der einzelnen wells wurden nach 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten sowie nach 24 Stunden mit einer an das Inversmikroskop (Axiovert 40C, Zeiss, Oberkochen, D) angeschlossenen Kamera

(Axiocam ERc5s, Zeiss, Oberkochen, D) fotografiert. Nach 4h oder 24 Stunden wurden die Zellen der einzelnen Ansätze zunächst durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und anschließend in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse des Zelltods wurde mittels FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit mit 7-Aminoactinomycin (kurz: 7-AAD) von der Firma BioLegend (San Diego, CA, USA) durchgeführt. Dafür wurden die vereinzelteten Zellen zunächst dreimal mit 1xDPBS gewaschen und anschließend in 100µl AnnexinV Binding Buffer aufgenommen. Die Färbung erfolgte nach Protokoll des Herstellers und die Proben wurden schließlich an einem NAVIOS™ Flow Cytometer vermessen.

#### **2.3.3.4 B-Zell-Depletion**

Von freiwilligen, gesunden Spendern wurde an Tag 1 eine entsprechende Menge Hirudin-Vollblut (S-Monovette®, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) abgenommen und davon je 200 µL pro well in eine 96 well TC-Platte vorgelegt. Eculizumab (Soliris®, Alexion Pharmaceuticals AG, New Haven, CT, USA; Endkonzentration im well=200 µg/mL) und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (50 units/mL) wurden in die entsprechenden Ansätze pipettiert. Anschließend wurden die spezifischen CD20-gerichtete Antikörper (IgA und IgG1) in einer Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 10) in entsprechenden Konzentrationen (50 µg/mL bis 0,005 µg/mL) in die wells pipettiert und der gesamte Versuchsansatz über Nacht in einem Brutschrank bei konstanten Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Bedingungen (37 °C/ 5 %) inkubiert. Am nächsten Tag wurden aus der 96 well Platte 100 µL jeder Probe in ein FACS-Röhrchen überführt und pro Probe 10µL Intratect (Biotest AG, Dreieich, D; hier Stocklösung = 10mg/mL) zugesetzt. Anschließend wurden die Messproben mit je 10µL der Oberflächenantigen-erkennenden, mit einem Flouorchrom-gekoppelten Antikörper (siehe Tabelle 26; hier: CD45-APC, CD3-Krome-Orange, CD19-FITC und die jeweiligen Isotypkontrollantikörper: IgG1-APC, IgG1-Krome-Orange und IgG1- FITC, alle von Beckman Coulter, Brea, CA, USA) im Dunkeln, auf Eis und für 30 Minuten gefärbt. Für die Erythrozytenlyse wurden die Proben nach der Inkubationszeit für wenige Minuten auf Raumtemperatur angewärmt und dann pro Probe 1mL Versalyse™ Lysing Solution (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) hinzupipettiert. Nach 20minütiger Inkubationszeit wurden die Proben für 5 Minuten bei 1600 rpm in einer Zentrifuge (Heraeus® Megafuge® 1.0 R, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) abzentrifugiert und die Erythrozytenlyse bei Bedarf ein zweites Mal wiederholt. Die Proben wurden nach der Erythrozytenlyse in 1mL FACS-Puffer gewaschen und anschließend in einem Endvolumen vom 300µL FACS-Puffer aufgenommen. Vor der Messung an einem NAVIOS™ Flow Cytometer wurden jeder Probe zusätzlich 100 µL Flow-Check™ Fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) zugefügt um auch absolute Zellzahlen pro µL berechnen zu können.

### **2.3.3.5 Deposition der Komplementfaktoren C1q und C4b**

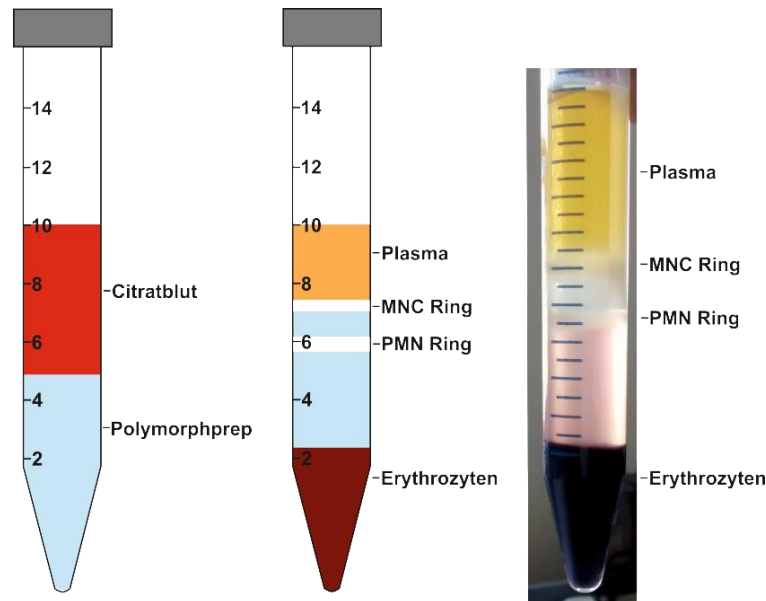
Die Fähigkeit der verschiedenen CD20-gerichteten Antikörper, die Komplementfragmente C1q und C4b anzulagern, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dafür wurden zunächst pro Probenansatz je  $2,5 \times 10^5$  SU-DHL4 Zellen in eine Mikrotiterplatte überführt. Die spezifischen Antikörper (RTX-IgA2.07RTX-IgG1, Ofa-IgA2.0/Ofa-IgG1, Obi-IgA2.0/Obi-IgG1, Ktrl.-IgA2.0/Ktrl.-IgG1) wurden in einer Endkonzentration von 10 µg/mL mit den Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Serum freiwilliger, gesunder Spender wurde zunächst auf Eis oder im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut und anschließend mit Eculizumab in einer Konzentration 200µg/mL Serum für mind. 15 Minuten inkubiert. Zu den Ansätzen, bestehend aus Zellen und spez. CD20-gerichteten oder Kontrollantikörpern, wurde dann 5% des Eculizumab-behandelten Serums hinzugefügt und anschließend wurden alle Proben 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben insgesamt dreimal für 2 Minuten bei 4°C und 1800 rpm in einer Zentrifuge (Heraeus® Megafuge® 1.0 R, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) abzentrifugiert und zwischendurch mit 125µL kaltem FACS-Puffer gewaschen. Jeweilige Sekundärantikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Human C1q Complement/FITC und Polyclonal Rabbit Anti-Human C4b Complement/FITC, Dako Denmark A/S, Glostrup, DK) wurden 1:20 in FACS-Puffer vorverdünnt und anschließend 25µL in die jeweiligen Versuchsproben hinzu pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden alle Proben erneut dreimal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und die Zellen in einer Zentrifuge pelletiert. Die Proben wurden schließlich an einem NAVIOS™ Flow Cytometer vermessen.

### **2.3.4 Isolierung von Effektorzellen aus peripherem Blut**

Die Isolation humaner PMN aus Citrat-Vollblut (S-Monovette® 8,2mL 9NC, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) gesunder, freiwilliger Spender wurde über einen Dichtegradienten unter Verwendung der Polymorphprep™ Solution (AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, NO) durchgeführt. Dafür wurden in ein 15mL Röhrchen (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) zuerst 5mL Polymorphprep™ vorgelegt und anschließend ca. 5 bis 7 mL des Citratblutes darüber geschichtet. Die Zentrifugation fand anschließend bei 2000 rpm für 30 Minuten und ohne Bremse statt. Nach der Zentrifugation wurden zuerst das Plasma und der MNC-Ring (siehe Abbildung 11) abgenommen. Erst danach wurden der Ring aus PMN sowie die darunterliegende Schicht, bestehend aus der Polymorphprep Solution, bis kurz vor die Erythrozyten-Schicht mit einer neuen sterilen serologischen Pipette (5 mL, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) abgenommen und in ein steriles 50mL Röhrchen (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) überführt. Die isolierten PMN wurden zweimal mit 1xDPBS gewaschen (mit 1xDPBS auf 50 mL auffüllen und bei 1800 rpm für 5 Minuten und bei Raumtemperatur zentrifugieren). Die Erythrozytenlyse fand im Anschluss statt. Dafür wurden die pelletierten PMN in 1mL 1xDPBS resuspendiert und danach mit 44 mL 4°C/eisgekühltem destilliertem Wasser (Distilled Water,



Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für 30 Sekunden und unter ständigem Invertieren inkubiert. Mit Ablauf der 30 Sekunden wurde der Ansatz mit 5 mL 10xDPBS substituiert, um die Isotonizität der Lösung wiederherzustellen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt



**Abbildung 11: Isolation humaner PMN per Dichtegradientenzentrifugation.** Links: Citrat-Vollblut gesunder, freiwilliger Spender wurde über eine Schicht Polymorphprep Solution geschichtet und anschließend zentrifugiert. Mitte und rechts: Die Plasma-, MNC- und PMN-Schichten wurden anschließend in sterile 50 mL Röhrchen überführt und die Effektorzellen gewaschen, gezählt und für den Versuch entsprechend weiterverarbeitet.

wurden die PMN schließlich in 5-10 mL des entsprechenden Zellkulturmediums aufgenommen und deren Zellzahl über eine Trypanblau-Färbung bestimmt.

### 2.3.5 Präparation von humanem Serum

Zur Präparation des Serums wurden gesunden Spendern unter Verwendung von S-Monovette® 7,5 mL Z Röhrchen von Sarstedt (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) Vollblut abgenommen. Durch die Anwesenheit eines Koagulationsfaktors im Serumröhrchen können, nach einer 30minütigen Inkubationszeit (auf Eis), alle geronnenen Blutbestandteile durch Zentrifugation (2000 rpm, 4 °C, 20 Minuten) entfernt, das Serum abgenommen und entweder frisch verwendet oder als Aliquote bei -80°C eingefroren werden.

### 2.3.6 Chrom<sup>51</sup>-Freisetzungsversuche

Alle in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zur ADCC und CDC monoklonaler CD20-gerichteter IgA- und IgG1-Antikörper wurden in <sup>51</sup>Chromfreisetzungsversuchen durchgeführt. Dazu wurden die spezifischen Antikörper in entsprechenden Konzentrationsreihen (50-0,016 µg/mL) in Zellkulturmedium verdünnt und in eine Mikrottestplatte (96 well, R, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) vorgelegt.  $0,6 \times 10^6$  Zielzellen wurden für 2 Stunden mit 200 µCi <sup>51</sup>Natriumchromat (5 mCi/mL, HARTMANN ANALYTIC GmbH, Braunschweig, D) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die mit

<sup>51</sup>Chrom-markierten Zellen dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen, auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^3/50\mu\text{L}$  eingestellt und in die Mikrotiterplatte pipettiert. Im letzten Schritt wurden entweder  $50\mu\text{L}$  der Effektorzellen (hier PMN, Zelldichte =  $8 \times 10^6/\text{mL}$ ) oder  $50\mu\text{L}$  humanes Serum als Quelle des Komplementsystems zum jeweiligen Ansatz hinzugegeben. Das Volumen der Reaktionsansätze in der Mikrotiterplatte betrug  $200\mu\text{L}$  pro well. Während das Verhältnis von Effektor-zu Zielzellen in ADCC Versuchen mit PMN 80:1 betrug, wurden sämtliche CDC Versuche mit einer Serumkonzentration von 25% v/v durchgeführt (sofern nicht anders angegeben). Alle Reaktionsansätze wurden nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei konstanten Temperatur- und  $\text{CO}_2$ -Bedingungen ( $37^\circ\text{C}/5\%$ ) per Zentrifugation pelletiert (2000rpm, 5 Minuten, bei Raumtemperatur). In eine flexible 96-well-Szintillations-Mikrotiterplatte (Flexible-96 Clear 96-well Flexible PET Microplate, round bottom, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) wurden  $150\mu\text{L}/\text{well}$  eines Szintillationsmixes (Optiphase HiSafe 3, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) vorgelegt und  $25\mu\text{L}$  der Zellkulturüberstände der jeweiligen Reaktionsansätze überführt. Die Szintillations-Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie (TopSeal-A PLUS, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) verschlossen und auf einem Orbitalschüttler (Titramax 101, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D) für 15 Minuten geschüttelt, um eine bestmögliche Durchmischung der Reaktionsansätze mit dem Szintillationsmix zu erreichen. In einem Szintillationsgerät (1450 MicroBeta®TriLux LSC & Luminiscence Counter, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) wurden die Platten anschließend vermessen, wobei die als „counts per minute“ (cpm) gemessene Szintillation (Szi) hier indirekt eine Aussage über die von den Zellen abgegebene Radioaktivität gibt. Die von den lysierten Zellen abgegebene  $\gamma$ -Strahlung regt die im Szintillationsmix beigemischten Szintillatoren an. Anschließend fallen diese unter Emission von Licht wieder auf ihr energetisches Ausgangsniveau zurück. Diese Lichtemission wird von einem Szintillationsgerät detektiert und in der Einheit cpm angegeben. Um Lysraten berechnen zu können, wurden außerdem sowohl die maximale <sup>51</sup>Cr- Freisetzung (= vollständige Lyse der Zielzellen) unter Verwendung von 1%igem Triton® X-100 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) als auch eine basale <sup>51</sup>Cr- Freisetzung, unter Abwesenheit Zielantigen-gerichteter monoklonaler Antikörper, Serum und Effektorzellen ermittelt. Die spezifische, prozentuale Lyse der Zielzellen wurde dann mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Lyse (\%)} = \frac{\text{ermittelte Szi (cmp)} - \text{basale Szi (cmp)}}{\text{maximale Szi (cmp)} - \text{basale Szi (cmp)}} * 100$$

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Bestimmung von Antikörperkonzentrationen in Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung spezifischer Produktionsraten antikörperproduzierender Zellklone wurden Zellkulturüberstände im Sandwich Enzyme linked immunosorbent assay (kurz: ELISA) untersucht. Dabei wird ein Antikörper (Siehe Tabelle 9) in einer geeigneten Verdünnung (1xDPBS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) in einen ELISA Streifen (Nunc-Immuno™ Module, Nalge Nunc International; Rochester, NY, USA) gecoated und nach einer 24 stündigen Inkubationszeit schließlich 100µL des jeweiligen zu untersuchenden Zellkulturüberstandes pro well für eine Stunde inkubiert. Die Detektion gebundener IgA Antikörper erfolgte anschließend mit einem geeigneten, Peroxidase-gelabelten Antikörper (siehe Tabelle 9). Dieser wurde ebenfalls in 1xDPBS vorverdünnt und in einem Volumen von 100µL in die wells gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde und dem Abstoppen der Reaktion mit 75 µL einer 3M Salzsäurelösung (HCl 25 %, Carl ROTH, Karlsruhe, D) wurde die Absorption des von der Peroxidase umgesetzten Substrates (Sigma Fast OPD™, MSX, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in einem *Plate reader* (Sunrise™ Plate-Reader, Tecan Group Ltd. Männerdorf, CH) bei einer Wellenlänge von 480 nm ausgelesen. Die ELISA-Streifen wurden standardmäßig zwischen allen Schritten des Versuches zwei-bis dreimal mit 125 µL eines Waschpuffers (1xDPBS+0,1 % v/w BSA, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D +0,05 % v/v Tween20 Merck Millipore, Billerica, MA, USA) gewaschen. Eine Konzentrationsreihe eines Ktrl.-IgA2.0 (40 µg/mL bis 0,002 µg/mL) Moleküls diente dabei als Eichkurve, um die Konzentration an potentiell produziertem Antikörper in Zellkulturüberständen nachweisen zu können.

**Tabelle 9: Antikörper für ELISA zum Nachweis der Antikörperproduktion in Zellkulturüberständen**

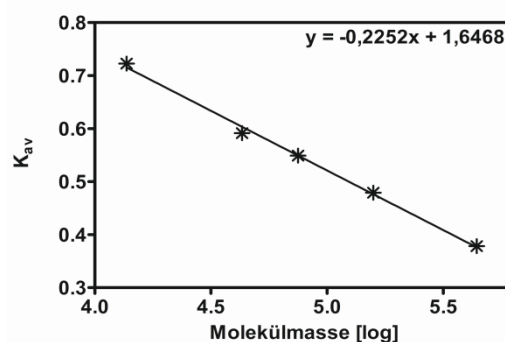
	<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Cat.No./Ref</b>	<b>Ver- dünnung</b>
<b>Coating Antikörper</b>	Goat Anti-Human Kappa-FITC	SouthernBiotech, Birmingham, AL,USA	2060-02	1:1000
	Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/FITC Rabbit F(ab') <sub>2</sub> (0,2g/L)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK	F0057	1:200
<b>Detektions- antikörper</b>	Anti-Human IgA (α-chain specific)–Peroxidase antibody produced in goat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	A0295 SIGMA	1:10000
	Goat anti HU Kappa Chain:HRP	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, D	BZL 07045	1:2000

### 2.4.2 Affinitätschromatographie

Antikörperhaltige und sterilfiltrierte (Stericup® and Steritop™ Vacuum Driven Sterile Filters, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) Zellkulturüberstände wurden in einem ersten Schritt per Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurde entweder die CaptureSelect™ IgA-CH1 (Hu) Affinity Matrix oder die CaptureSelect™ LC-kappa (Hu) Affinity Matrix (beide Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mit den Zellkulturüberständen über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Matrix durch zentrifugieren (2000rpm, 20 min, 4°C) geerntet und anschließend auf Poly-Prep® Chromatography Columns (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) überführt. Nach zwei Waschschritten mit 1xDPBS wurden die gebundenen Antikörper mit einem geeigneten Volumen eines 0,1 molaren Glycin-Puffers (pH 3) von der Matrix eluiert (Elutionspuffer). Aufgrund des sauren pH-Wertes des Elutionspuffers wurde das Eluat in einem geeigneten Volumen eines Neutralisationspuffers (1 M Tris-Puffer, pH 8,9) aufgefangen. Die Aufreinigung antikörperhaltiger Zellkulturüberstände fand nach den Herstellerangaben der jeweiligen verwendeten Affinitätsmatrizes „CaptureSelect™“ von Thermo Fisher Scientific statt. Alle für diese Arbeit präparierten IgA Antikörper wurden durch einen Dialysesschritt gegen 1xDPBS umgepuffert. Dazu wurden die Antikörperpräparationen mithilfe einer Dialysiermembran (ZelluTrans/Roth Dialysiermembranen, MWCO 3500, Flachbreite 19 mm, Länge 15 m, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) gegen ein geeignetes Volumen 1xDPBS bei 4°C für 48 Stunden unter ständigem Rühren dialysiert. Zusätzlich wurden die Antikörper außerdem durch Zentrifugation in Vivaspin Säulen (Vivaspin® 6, 10.000 MWCO PES, Sartorius AG, Göttingen, D) in ihrem Volumen eingeengt (auf ca. 1mL) und somit ankonzentriert.

### 2.4.3 Größenausschlußchromatographie

Alle in dieser Arbeit präparierten Antikörperproben wurden über eine Gelfiltrationssäule



**Abbildung 12:** *K<sub>av</sub>*-Werte bekannter Referenzproteine (Ferritin, Aldolase, Conalbumin, Ovalbumin und Ribonuklease A) aufgetragen gegen ihre logarithmierte Molekülmasse. Mithilfe einer linearen Regression der Datenpunkte und deren angegebener Geradengleichung können Abschätzungen der Molekülmassen von produzierten Antikörpern anhand ihrer Elutionsvolumina von der Säule gegeben werden.

(Superdex200 10x30mm, GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) mithilfe des ÄKTA purifier

10 (GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) größenaußschlußchromatographisch aufgetrennt. Vor der präparativen Inbetriebnahme wurde die Säule jeweils mit dem zweifachen Säulenvolumen 1xDPBS äquilibriert. Außerdem fand im Vorfeld eine Eichung der Säule mit dem Gelfiltrations-Kit (GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) statt. Hierbei konnten mithilfe aufgetragener Referenzproteine und deren Elutionsprofilen Abschätzungen über das Molekulargewicht der produzierten Antikörper gegeben werden. Zur Eichung der Säule wurde das Gel Filtration Calibration Kit (HMW+LMW; GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) mit den Referenzproteinen Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (44kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa) durchgeführt. Kav-Werte einzelner Proteine wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:  $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$  wobei  $V_e$  für das Elutionsvolumen der Proteine,  $V_o$  für das Totvolumen der Säule (2 mL) und  $V_c$  für das Säulenvolumen insgesamt (24 mL) steht. Werden  $K_{av}$ -Werte einzelner Referenzproteine gegen ihre jeweilige logarithmierte Molekülmasse aufgetragen, können später durch Auflösung der Geradengleichung der linearen Regression der Datenpunkte auch die Molekülmassen verschiedener anderer Proteine (hier: verschiedene CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper) berechnet werden. Mehr jedoch als das Berechnen der Molekülmassen der verschiedenen CD20-IgA2.0 Antikörper standen die Präparation monomerer IgA Antikörper und das Aussortieren von freien leichten Ketten, Antikörperdimeren und -polymeren dabei im Vordergrund.

Die Antikörperproben (1 mL) wurden zu Beginn eines jeden Laufes per Hand über den sog. Proben-Loop in das System eingespeist. Alle Proben liefen mit einer Flussrate von 0,1mL/min über die angeschlossene Säule. Während des Laufes wurden der pH-Wert, die UV-Absorption und die Konduktivität der Messproben kontinuierlich vom ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) und der dazugehörigen Software (Unicorn 5.01 Software, GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) gemessen und aufgezeichnet.

#### 2.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung und Kapillargelelektrophorese

Die Konzentrationsbestimmungen der gereinigten Proteine erfolgte photometrisch in einem Photometer (BioPhotometer Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg, D), indem 50 µL der Antikörperpräparationen (oder deren Verdünnungen) in Küvetten (UV-transparente Einmal-Küvetten, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D) bei 280 nm vermessen wurden. Auch die Konzentration sämtlicher in der Arbeit verwendeten Kontrollantikörper wurde photometrisch bestimmt. Dabei werden die jeweiligen Konzentrationen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Konz.} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{UV_{280} - UV_{320}}{1,32}$$

Dabei ist 1,32 der für IgA Antikörper angegebene Extinktionskoeffizient. Bei einer Extinktion (im Englischen *Absorbance*) von 1 (280 nm) beträgt die Konzentration der Lösung 1,32 mg/mL (Howard and Kaser, 2013).

Außer der photometrischen Konzentrationsbestimmung der Proteine war zusätzlich auch die automatisierte Kapillargelelektrophorese (Experion™ Automated Electrophoresis System, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) im Labor etabliert. Hierbei wurden die aufgetragenen Proteine mit Hilfe einer automatisierten Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die gemessenen Elektropherogramme anschließend als umgerechnete virtuelle Gelbilder ausgelesen. Neben dem Laufverhalten der Proteine im Gel macht das System außerdem Angaben zu den Konzentrationen (in µg/mL) der aufgetragenen Proben, die bei der Messung im Vergleich zu systeminternen Referenzwerten bestimmt und anschließend ausgegeben werden. Alle eingesetzten Antikörper wurden nach Herstellerangaben sowohl unter reduzierten als auch unter nicht-reduzierten Bedingungen vorbereitet, auf den Chip aufgetragen und der Lauf gestartet. Sowohl die vom System berechneten Konzentrationen der aufgetragenen Antikörperpräparationen als auch die Daten für ein gerechnetes Gelbild konnten aus der Software des Experion Systems herausgelesen werden.

#### **2.4.5 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Affinitäts- oder größenchromatographisch aufgereinigte Antikörper wurden unter Verwendung von Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gelen (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit 5xLaemmli Puffer (Tabelle 24) unter nicht-reduzierten oder unter reduzierten (100µL 5xLaemmli Puffer + 2,3 µL 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) versehen und anschließend für 10min bei 95°C in einem Heizblock (Stuart™ Block Heater SBH130D, Stuart Equipment, Cole-Parmer, Staffordshire, UK) erhitzt. Zusätzlich zu den Untersuchungsproben wurde auf jedes SDS-Gel ein Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) zur Abschätzung des Molekulargewichtes der aufgetragenen Proben aufgetragen. Die beladenen SDS-Gele wurden in Elektrophoresekammern (Mini-PROTEAN® Tetra HandcastSystem, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) überführt, die Kammer mit einem 0,1% SDS-Gellaufpuffer (25 mM Tris + 192mM Glycin + 0,1 % w/v SDS, pH 8,3) befüllt und an eine Spannung angeschlossen (PowerPac™ HC Power Supply, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Die Laufzeit betrug ca. 90 Minuten bei einer angelegten Spannung von 100V.

Die sich im SDS-Gel befindenden Proteinbanden wurden im Anschluss durch eine Coomassie-Färbung der SDS-Gele mit dem Mikrowellenprotokoll des SimplyBlue Safe Stain Kits (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben detektiert.

#### 2.4.6 Western-Transfer Experimente

Im ersten Schritt der Immundetektion der IgA und jeweiligen Kontrollantikörper wurden die Präparationen wie in Punkt 2.4.5 beschrieben per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. In einer TRANS-BLOT® SD Semi-Dry Transferzelle (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) wurden die Proteinbanden der SDS-Gele auf eine Polyvinylidenfluorid PVDF Membran (Amersham Hybond-P optimized for protein transfer, GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) transferiert, die zuvor mit Methanol (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) aktiviert wurde. Der Semi-Dry-Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran fand unter Anwesenheit von Anderson Puffer (6 g Tris +28,8 g Glycin + 10 mL 10% SDS-Lösung + 200mL Methanol), mit einer Laufzeit von 90 min und einer Stromstärke von 50 mA pro Gel statt. Die Membranen wurden nach dem Transfer entweder bei 4°C über Nacht oder eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Blockadepuffer (3,2 % BSA + 2 % Milchpulver, beides Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) blockiert. Der Primärantikörper (hier Peroxidase gelabelt) wurde in einem Färbepuffer 1 (2 % BSA und 1 % Milchpulver) verdünnt wie angegeben (entweder anti human IgA POX 1:10000 Sigma oder anti human kappa-HRP 1:2500 Biozol). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln wurden die Membranen zuerst zweimal mit dem Western Blot Puffer 2, anschließend dreimal mit Western Blot Puffer 1 und letztlich einmal mit 1xTBS Puffer für je 10 Minuten gewaschen. Die Chemilumineszenz der geblotteten Proteine konnte mit dem SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) entwickelt und anschließend mit dem Gel Doc™ XR+ System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) visualisiert werden.

#### 2.4.7 Grafische und statistische Auswertung der Daten

Die grafische Auswertung aller Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, fand mit GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Alle angegebenen statistischen Auswertungen der erhobenen Daten sowie die ausgegebenen Signifikanzniveaus wurden ebenfalls GraphPad Prism 4.0. berechnet. Signifikantbereiche ergeben sich wie folgt:

$$p < 0,05 = */\#, \quad p < 0,01 = **/##, \quad p < 0,001 = ***/###.$$

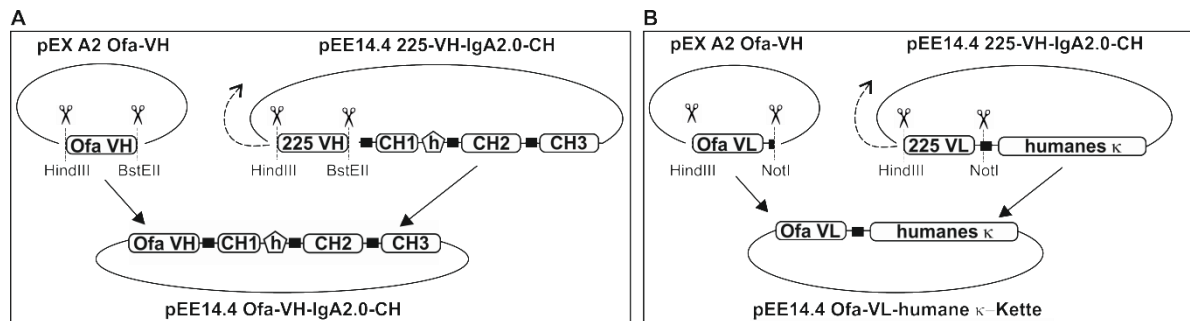
Alle Daten wurden, falls nicht anders vermerkt, als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Produktion und biochemische Charakterisierung CD20 gerichteter IgA Antikörper

##### 3.1.1 Generierung geeigneter Expressionsvektoren

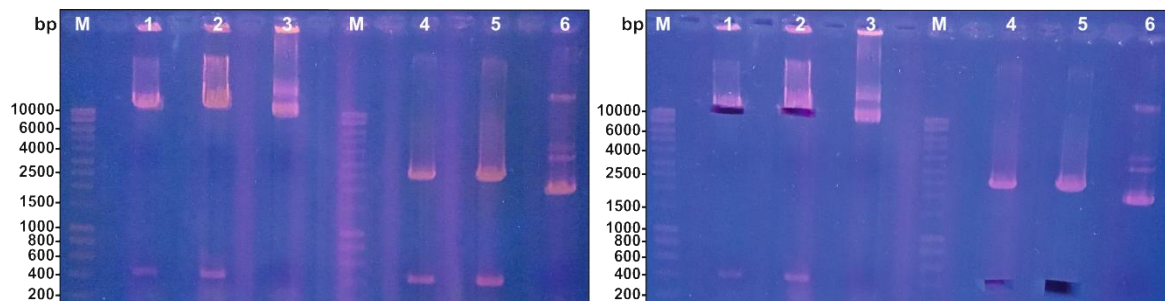
Zu Beginn dieser Arbeit lagen Expressionsvektoren für das GS Gene Expression System™ von der



**Abbildung 13: Klonierungsschema der Expressionsvektoren der schweren- oder der leichten Kette des Ofa-IgA2.0 Moleküls.** A Klonierung des Expressionsvektors für die schwere Antikörperkette. Die variable Region der schweren Kette wurde mithilfe eines Verdau des pEX A2 Ofa-VH Vektors mit HindIII und BstEII erhalten und in den ebenfalls verdauten Ausgangsvektor pEE14.4 IgA2.0-CH ligiert. B Klonierung des Expressionsvektors für die leichte Antikörperkette. Die variable Region der leichten Kette wurde mithilfe eines Verdau des pEX A2 Ofa-VL mit HindIII und NotI erhalten und in den ebenfalls verdauten Ausgangsvektor pEE14.4-humane κ-Kette ligiert.

Lonza Group AG (hier: pEE14.4) für einen EGFR gerichteten IgA2.0 Antikörper vor. Dieser wurde als Ausgangsvektor für die weiteren Klonierungsschritte verwendet (Klonierungsschema Abbildung 13).

Die variablen Regionen zugelassener CD20 gerichteter Antikörper (Rituximab, Ofatumumab und

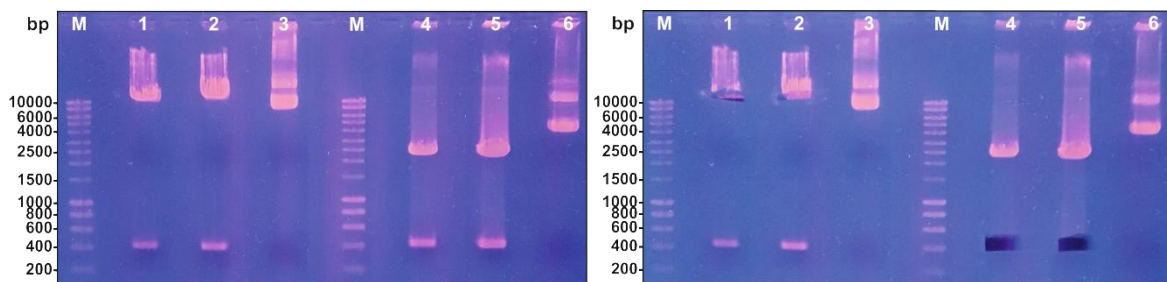


**Abbildung 14: Agarosegelelektrophorese der Expressionsvektoren kodierend für die schwere Kette nach Restriktionsverdau.** Sowohl der Ausgangsvektor pEE14.4 225-VH-IgA2.0-CH (Spur 1-3) sowie der *de novo* synthetisierte Zwischenplasmid pEX A2 Ofa-VH (Spur 4-6) wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI verdaut. In Spur 3 und 6 sind die jeweiligen Plasmide ohne Restriktionsenzyme als Laufkontrolle aufgetragen. M=Größenstandard/Marker. Links: Laufmuster des Gelbildes nach Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. Rechts: Laufmuster des Gelbildes nach dem Ausschneiden der linearisierten Inserts.

Obinutuzumab) wurden *de novo* von der Firma Eurofins synthetisiert. Die bereits im Labor vorliegenden Expressionsvektoren für die schwere Kette eines optimierten IgA2.0 Antikörpers wurden durch einen Verdau mit HindIII-HF und NotI-HF mit den neu synthetisierten variablen anti-CD20 Regionen der schweren Kette kombiniert (Abbildung 14). Die erhaltenen DNA-Fragmente wiesen die erwartete Mobilität im Gel entsprechend von ca. 12700 bp auf. Die Leichtkettenkonstrukte konnten ebenfalls mithilfe eines Verdau generiert werden, wobei hier die Restriktionsenzyme HindIII-HF und BstEII-HF miteinander kombiniert wurden (Abbildung 15). Auch hier zeigten die DNA-Fragmente das erwartete Laufverhalten im Gel bei ca. 10600 bp.



Ausgeschnittene DNA Fragmente wurden über einen Ligationsschritt zum neuen

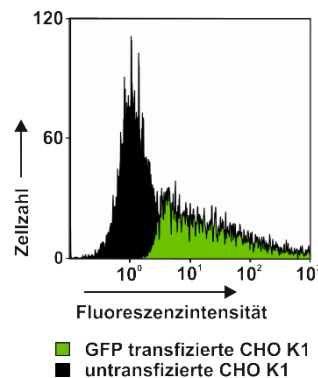


**Abbildung 15: Agarosegelelektrophorese der Expressionsvektoren kodierend für die leichte Kette nach Restriktionsverdau.** Sowohl der Ausgangsvektor pEE14.4 225-VL-humane  $\kappa$ -Kette (Spur 1-3) sowie der *de novo* synthetisierte Zwischenplasmid pEX A2 Ofa-VL (Spur 4-6) wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und BstEI verdaut. In Spur 3 und 6 sind die jeweiligen Plasmide ohne Restriktionsenzyme als Laufkontrolle aufgetragen. M=Größenstandard/Marker. Links: Laufmuster des Gelbildes nach Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. Rechts: Laufmuster des Gelbildes nach dem Ausschneiden der linearisierten Inserts.

Expressionskonstrukt verknüpft. Dieses konnte in chemisch kompetenten *E.coli* Zellen vervielfältigt und mithilfe üblicher Plasmid-Präparationskits erhalten werden. Die Überprüfung der Richtigkeit der variablen Domänen der Schwer- und Leichtkettenvektoren fand durch Sanger Sequenzierung statt. Mithilfe von Sequenz-Alignments konnte die Richtigkeit der erhaltenen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Expression CD20 gerichteter IgA2.0 Antikörper in CHO K1 Zellen

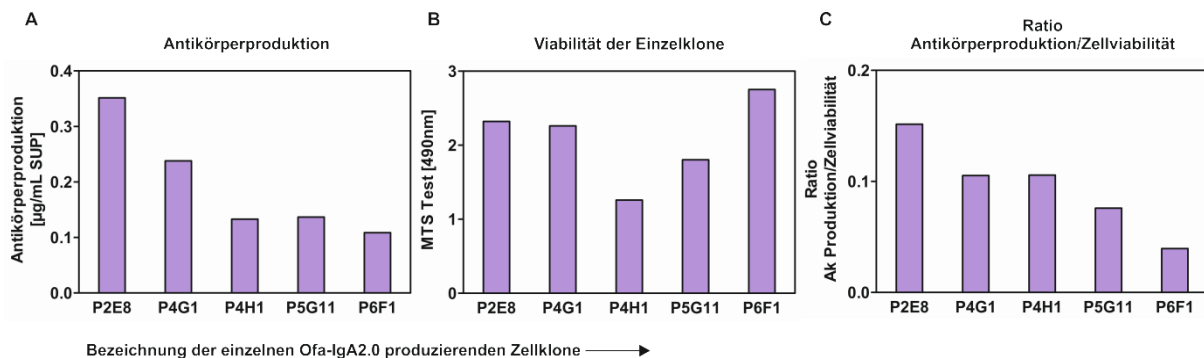
Die in 3.1.1 hergestellten Expressionsplasmide von RTX-IgA2.0, Ofa-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 wurden zur Herstellung antikörperproduzierender Zellen verwendet. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen eines



**Abbildung 16: FACS-Kontrolle der GFP-transfizierten CHO-K1 Zellen.** Die Überprüfung der mit dem Kontrollplasmid transfizierten CHO-K1 Zellen fand 72h nach der Transfektion statt um die Transfektionseffizienz zu überprüfen.

spezifischen für die leichte Kette kodierenden Plasmides zusammen mit dem kodierenden Plasmid spezifisch für die schwere Kette durch Lipofektion in CHO K1 Zellen transfiziert. Eine Kontrolltransfektion mit einem GFP-Plasmid wurde mit demselben Protokoll durchgeführt, um die Transfektionseffizienz des Versuchstages zu überprüfen (Abbildung 16). Die Selektion antikörperproduzierender Zellklone fand mit 50  $\mu$ M MSX statt. Entstehende Einzelzellklone wurden in 96-well Zellkulturschalen überführt und deren spezifischen Produktionsraten bestimmt. Um die spezifischen Produktionsraten zu ermitteln wurden zum einen potentiell antikörperhaltige

Zellkulturüberstände (aus den 96-well Platten) in einem spezifischen ELISA auf den Gehalt von Antikörpern untersucht. Zum anderen wurde die Viabilität der Einzelzellklone mithilfe des MTS

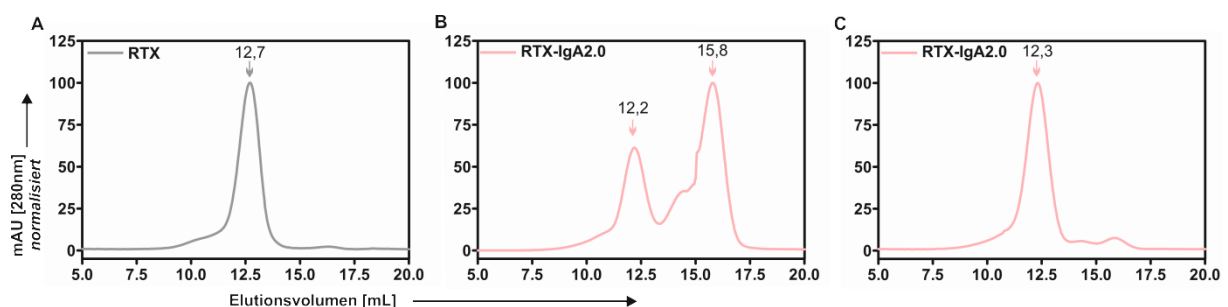


**Abbildung 17 Analyse der Produktionsraten antikörperproduzierender Einzelzellklone (hier beispielhaft dargestellt: Ofa-IgA2.0).** Dargestellt sind exemplarisch 5 Einzelklone Ofa-IgA2.0 produzierender CHO K1 Zellklone. A) ELISA potentiell antikörperhaltiger Zellkulturüberstände. B) Die Viabilität der antikörperproduzierenden Einzelzellklone wurde mittels MTS-Test bestimmt. C) Das Verhältnis von Antikörperproduktion und Viabilität gibt Aufschluss über die Antikörperproduktionsrate einzelner Zellklone.

Testes bestimmt, um im Anschluss für jeden Einzelklon ein Verhältnis von Antikörperexpression zu Zellviabilität berechnen zu können (Abbildung 17). Zellklone mit einem hohen Verhältnis zwischen Expression und Viabilität wurden anschließend für die weiterführende Antikörperproduktion in größerem Maßstab kultiviert und zeitnah kryokonserviert. Zellkulturüberstände produzierender Einzelklone wurden über 4 bis 8 Wochen gesammelt und die darin enthaltenden CD20-gerichteten IgA Antikörper im Anschluss gereinigt, um sie biochemisch und funktionell charakterisieren zu können.

### 3.1.3 Reinigung CD20 gerichteter IgA2.0 Antikörper aus Zellkulturüberständen

Die Reinigung monoklonaler IgA Antikörper fand in einem ersten Schritt über die



**Abbildung 18: Größenausschlusschromatographie eines CD20-gerichteten IgG1 und IgA2.0 Moleküls.** In A ist das Elutionsprofil des RTX-IgG1 Antikörpers gezeigt. Das Elutionsprofil einer RTX-IgA2.0 Präparation nach anti-humane-kappa-Ketten gerichteter Affinitätschromatographie (B). In C ist die RTX-IgA2.0 Präparation nach einer ersten Größenausschlusschromatographie gezeigt.

Affinitätschromatographie statt. Dazu wurden die spezifischen IgA Antikörper (RTX-IgA2.0, Ofa-IgA2.0 und Obi-IgA2.0) mithilfe einer anti-humane kappa Kette Matrix (beide CaptureSelect™) aus den Zellkulturüberständen gereinigt. Im Anschluss wurde eine Größenausschlusschromatographie (kurz: GAC) durchgeführt, um monomere Antikörperpräparationen zu erhalten. Antikörperpräparationen,

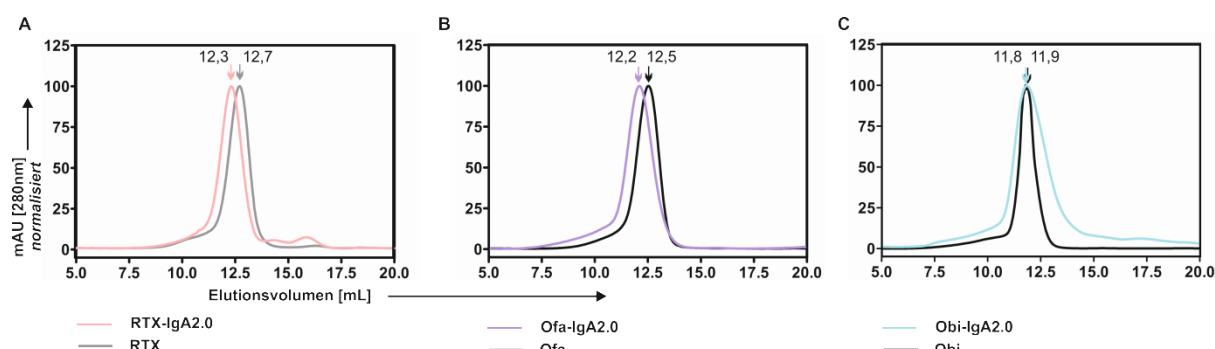
die über eine anti-humane-kappa-Kette Matrix gereinigt wurden, wiesen in der Vergangenheit mindestens zwei verschiedene Absorptionsmaxima in ihren Elutionsprofilen auf. Ein Überschuss an freien leichten Ketten kann zum Absättigen der verwendeten Affinitätsmatrix führen. Die freien Leichtketten, die anschließend zusammen mit den vollständig zusammengebauten Antikörpern eluiert wurden, mussten in einem nächsten Aufreinigungsschritt von diesen getrennt werden, um eine monomere Antikörperpräparation zu erhalten. Durch das Ermitteln des Laufverhaltens einzelner Referenzproteine und deren bekannter Molekülmassen (siehe Material und Methoden, Abbildung 12) konnten die Molekülmassen verschiedener CD20-gerichteter IgA2.0 und -IgG1 Antikörper anhand ihrer Elutionsvolumina abgeschätzt werden, da durch die ermittelten Molekülmassen eine monomere Antikörperpräparation angenommen werden konnte. In Abbildung 18 A ist das Elutionsprofil von RTX dargestellt. Für RTX konnte ein Absorptionsmaximum bei einem Elutionsvolumen von 12,7mL nachgewiesen werden, was einer errechneten Molekülmasse von 142,2kDa entspricht. Daraufhin

**Tabelle 10: Elutionsvolumina und berechnete Molekülmassen verschiedener CD20-gerichteter IgA und IgG1 Antikörper nach Größenausschlußchromatografie.** Molekülmassen wurden anhand einer Eichgeraden berechnet, deren Verlauf von den Laufeigenschaften eingesetzter Referenzproteine abhängig war.

Antikörper	Elutions- volumen [mL]	Errechnete Molekülmasse der Antikörper [kDa] nach GAC
RTX-IgA2.0 peak 1	12,3	169,67
RTX-IgA2.0 peak 2	15,8	33,67
RTX	12,7	142,2
Ofa-IgA2.0	12,2	187,07
Ofa	12,5	154,61
Obi-IgA2.0	11,8	199,63
Obi	11,9	191,91

konnte angenommen werden, dass dieses ermittelte Absorptionmaximum bei einem entsprechenden Elutionsvolumen für eine monomere Antikörperpräparation spricht. Für affinitätschromatografisch gereinigte RTX-IgA2.0 Präparationen wurden Elutionsprofile mit zwei verschiedenen Peaks nachgewiesen (Abbildung 18 B). Anhand der Berechnungen der Molekülmassen der Eichgeraden kann angenommen werden, dass das erste Absorptionsmaximum (bei einem Elutionsvolumen von 12,2mL  $\hat{=}$  169,67kDa) die monomere Antikörperfraktion und das zweite Absorptionsmaximum (Elutionsvolumen: 15,7mL  $\hat{=}$  33,67kDa) kleinere Proteinfragmente wie z.B. freie kappa-Leichtketten Präparationen darstellen könnten. Um für funktionelle Versuche monomere Antikörperpräparationen zu erhalten, wurden ausschließlich Elutionsvolumina von 11,5 bis 12,5 mL der jeweiligen Größenausschlußchromatographien gesammelt und verwendet. In Abbildung 18 C ist die monomere RTX-IgA2.0 Präparation nach einer Affinitäts- und zwei Größenausschluß-

chromatographien dargestellt. Alle Reinigungsschritte zur Präparation monomerer Antikörper wurden anschließend sowohl für den Ofa-IgA2.0 als auch für den Obi-IgA2.0 Antikörper durchgeführt. Zusätzlich zu den hergestellten spezifischen CD20 gerichteten IgA Antikörperpräparationen wurden auch die parentalen IgG1 Antikörper (RTX, Ofa und Obi) so größenausschlußchromatografisch aufgetrennt und deren Elutionsprofile erfasst. Für RTX, Ofa und Obi konnte nach der Größenausschlußchromatographie jeweils nur ein einziges



**Abbildung 19: Größenausschlußchromatographie der CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörper mit ihrem jeweiligen parentalen CD20-gerichteten IgG1 Antikörper im Vergleich.** Die über die Gelfiltrationssäule (Superdex200 10x30mm, GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK) aufgereinigten Antikörperproben wurden mithilfe des ÄKTA purifier 10 und der dazugehörigen Software bzgl. ihres pH-Wertes, der UV-Absorption und der Konduktivität der Messproben vermessen. mAU-Werte bei 280nm sind dabei über das Elutionsvolumen aufgetragen. In farbig sind alle IgA2.0 Moleküle, in Graustufen die jeweiligen parentalen IgG1 Moleküle im Vergleich gezeigt.

Absorptionsmaximum erfasst werden. Während das Absorptionsmaximum bei RTX bei einem Elutionsvolumen von 12,7mL lag, konnte für Ofa ein Elutionsvolumen von 12,5mL und für Obi eines von 11,9mL detektiert werden. Somit war für alle CD20-IgG1 Antikörper eine weitere chromatografische Aufreinigung nicht nötig, da durch die ermittelten Molekülmassen eine monomere Antikörperpräparation angenommen werden konnte. Der Vergleich der verschiedenen IgA2.0 und IgG1 Paare zeigte, dass alle IgA2.0 Antikörper in früheren Fraktionen von der Säule eluierten als ihre jeweiligen parentalen IgG1 Antikörper (siehe Abbildung 19, RTX-IgA2.0 bei 12,3mL vs. RTX bei 12,7mL; Ofa-IgA2.0 bei 12,2mL vs. Ofa bei 12,5mL; Obi-IgA2.0 bei 11,8mL vs. Obi bei 11,9mL). Während sich die größenausschlußchromatographisch ermittelten Molekülklassen der drei

**Tabelle 11: CD20-IgG1-Antikörper und deren Molekülmassen (nach „drugbank“-Einträgen) sowie deren errechnete Molekülmassen nach Größenausschlußchromatografie**

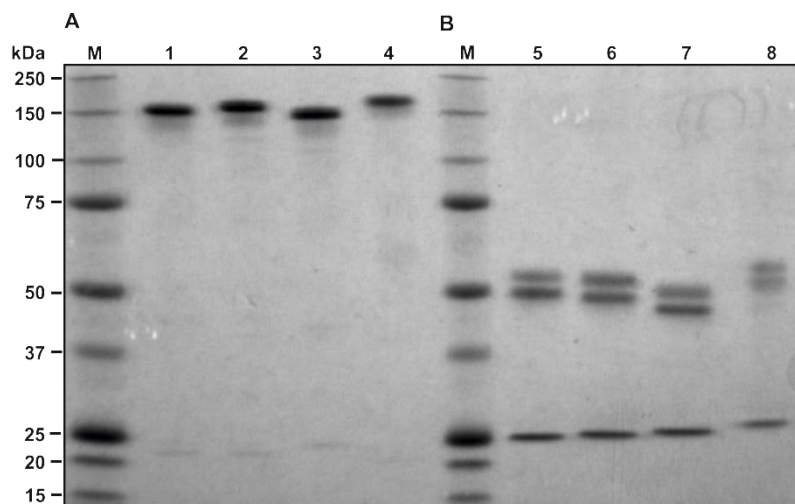
Antikörper	Molekülmasse nach „Drugbank“-Eintrag [kDa]	Errechnete Molekülmasse der Antikörper [kDa] nach GAC
Rituximab	143,8	142,2
Ofatumumab	146,1	154,6
Obinutuzumab	146,1	191,9

verschiedenen CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörper damit im Vergleich zu den anhand ihrer Aminosäuresequenz berechneten Molekülmassen um bis zu 50 kDa (Vgl. Tabelle 10 und Tabelle 12)

unterschieden, variierten die über die GAC errechneten Molekülmassen der parentalen anti-CD20-IgG1 Moleküle kaum mit den von der *Drugbank* angegebenen Molekülmassen (*Drugbank*, Rituximab, 2005; *Drugbank*, Ofatumumab, 2008; *Drugbank*, Obinutuzumab, 2014) bis auf den Obinutuzumab-Antikörper kaum (Tabelle 11 & Tabelle 12). Über die Aminosäuresequenz berechnete Molekülmassen wiederum geben keinerlei Aufschluss über den Grad der Glykosylierung verschiedener Antikörper. Obwohl das IgA2.0 Antikörperformat bereits weniger Glykosylierungsstellen als ein IgA2wt Molekül aufweist (Lohse *et al*, 2016), ist eine Beeinflussung des Laufverhaltens durch unterschiedliche und heterogene Glykosylierung der IgA2.0 gegenüber IgG1 Formaten denkbar. Nach der erfolgten Größenausschlusschromatographie wurden die Antikörperpräparationen unter der Verwendung verschiedener biochemischer Methoden auf Reinheit, Qualität und Menge hin überprüft.

### 3.1.4 Qualitätskontrolle und Quantifizierung hergestellter CD20-IgA2.0 Antikörper

Alle präparierten IgA2.0 Antikörper sowie ein Ktrl.-IgA2.0 wurden mithilfe einer SDS-PAGE mit



**Abbildung 20: SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung nicht-reduzierter und reduzierter CD20-gerichteter IgA2.0 und Ktrl.-IgA2.0 Proben.** A: Spur 1) RTX-, Spur 2) Ofa-, Spur 3) Obi- und Spur 4) Ktrl.IgA2.0 unter nicht reduzierenden Bedingungen in B: Spur 5) RTX-, Spur 6) Ofa-, Spur 7) Obi- und Spur 8) Ktrl.IgA2.0 aufgetragen unter reduzierenden Bedingungen. Auftragsmenge = 2 µg pro Antikörper, M=Marker

anschließender Coomassie-Färbung auf Integrität und Reinheit hin überprüft. Die Ergebnisse dieser SDS-PAGE sind in Abbildung 20. Unter reduzierenden Bedingungen erscheint eine deutliche Bande bei ca. 150 bis 160kDa. Aufgrund der errechneten Molekülmasse (siehe Tabelle 12) der verschiedenen CD20 gerichteten IgA Antikörper kann angenommen werden, dass diese Bande den vollständig intakten Antikörper zeigt. Die etwas unterschiedlichen Laufhöhen der verschiedenen IgA2.0 Antikörper ist auf die unterschiedlichen V-Regionen der Antikörper zurückzuführen. In der elektrophoretischen Auftrennung sind keine Proteine mit einer den freien leichten Ketten entsprechenden Molekülmasse von ca. 25 kDa nachzuweisen, was auf eine einheitliche monomere Antikörperpräparation schließen lässt. Auf der rechten Seite der Abbildung sind alle Antikörper in gleicher Reihenfolge und Konzentration unter reduzierenden Bedingungen gezeigt. Für die

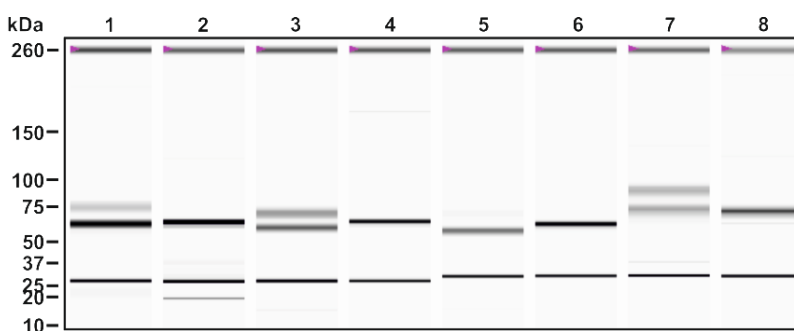
aufgetragenen IgA Antikörper ist bei ca. 25 kDa eine Bande abgebildet, die vermutlich die leichten Ketten repräsentiert. Die unterschiedlichen CD20-IgA2.0 und der Ktrl.-IgA2.0 Antikörper unterscheiden sich hier nicht. Weiterhin sind für alle Präparationen zwei weitere Banden erkennbar die ca. zwischen 50 und 60kDa liegen.

**Tabelle 12: CD20-gerichtete IgA2.0 und –IgG1-Antikörper und deren errechnete Molekülmassen (nach Aminosäuresequenz) sowie deren Laufhöhe in der SDS-PAGE**

Name des Antikörpers	Errechnete Molekülmasse [kDa]	Laufhöhe SDS PAGE nach STD [kDa]
<b>RTX-IgA2.0</b>	150,2	~150
<b>Ofa-IgA2.0</b>	146,8	~160
<b>Obi-IgA2.0</b>	148,6	~145-150
<b>Ktrl.-IgA2.0</b>	145,8	~180

Aufgrund ihrer Molekülmasse werden diese Banden entsprechend den schweren Ketten der IgA Antikörper zugerechnet. Das Auftreten des Doppelbandenlaufmusters ist typisch für IgA Antikörper und wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. Eine unterschiedliche Glykosilierung der schweren Ketten des zusammengebauten Antikörpers wird als Grund für das veränderte Laufverhalten angenommen.

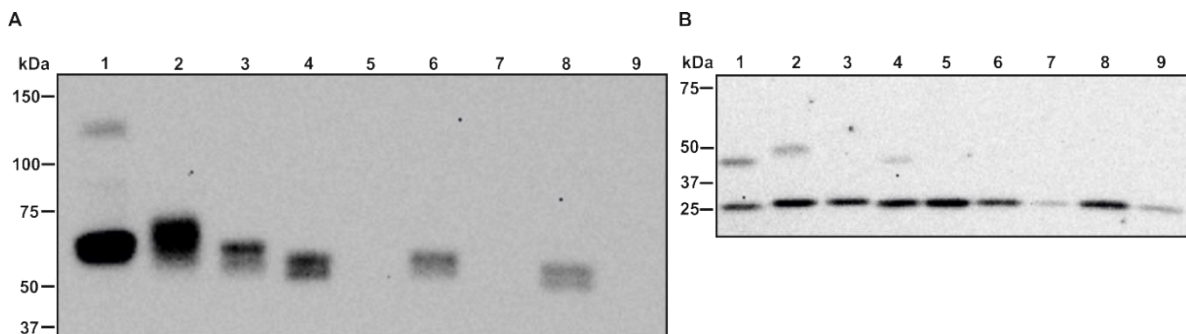
Obwohl die in der SDS-PAGE gewonnenen Ergebnisse Informationen zum Laufverhalten der getesteten Antikörper geben konnten, wurden die Antikörperbanden zusätzlich im Western Blot auf



**Abbildung 21: Automatische Kapillarelektrophorese der CD20-gerichteten IgA2.0 mAk produziert in HEK FreeStyle™ 293-F Zellen sowie deren parentalen IgG1 Antikörper und jeweilige Isotypkontrollen.** Alle Antikörperproben wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels der Experion Technologie aufgetrennt und analysiert. M=Marker, Spur 1) RTX-IgA2.0, Spur 2) RTX, Spur 3) Ofa-IgA2.0, Spur 4) Ofa, Spur 5) Obi-IgA2.0, Spur 6) Obi, Spur 7) Ktrl.-IgA2.0 und Spur 8) Ktrl.-IgG1

ihre Identität hin überprüft. Produzierte CD20-IgA2.0 Antikörper wurden zusammen mit ihren parentalen –IgG1 Antikörpern sowie verschiedenen Kontrollantikörpern zunächst unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF Membran mit entweder einem anti-humanen-IgA-POX (Abbildung 22 A) oder einem anti-humanen-kappa-HRP Antikörper (Abbildung 22 B) gefärbt. Während in Abbildung 22A mit einem anti-humanen-IgA-POX Antikörper ausschließlich Banden für IgA Antikörper nachgewiesen werden konnten, waren in Abbildung 22B für jeden aufgetragenen Antikörper Signale nachweisbar, da die Detektion hier mit

einem Antikörper erfolgte, der spezifisch die humane-kappa-Leichtkette von sowohl IgA- als auch IgG Antikörpern erkennt. Unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen sind in Abbildung 22A wie bereits im Coomassie-Gel erkennbar, Doppelbanden für IgA2.0 Moleküle sichtbar (Spur 3, 4, 6 und 8). Das Signal für ein Ktrl.-IgA2wt Molekül (Spur 2) erscheint nicht in einer deutlichen Doppelbande, wobei die aufgetragene Antikörperkonzentration eine Rolle spielen könnte. Alle in Abbildung 22A detektierten Signale sind IgA spezifisch, wobei für aufgetragene IgG1 Moleküle keine Signale sichtbar wurden. In Abbildung 22B können sowohl für IgA also auch IgG1 Antikörper Signale detektiert werden. Da sowohl IgA als auch IgG1 Antikörper in diesem Versuch über eine humane kappa-Leichtkette verfügten, konnte diese spezifisch nachgewiesen werden. Antikörperpräparationen der verschiedenen CD20 gerichteten IgA Antikörper aus zwei verschiedenen Produktionssystemen sowie deren parentale IgG1 Pendants wurden letztlich im Experion System nochmals auf ihr Laufverhalten

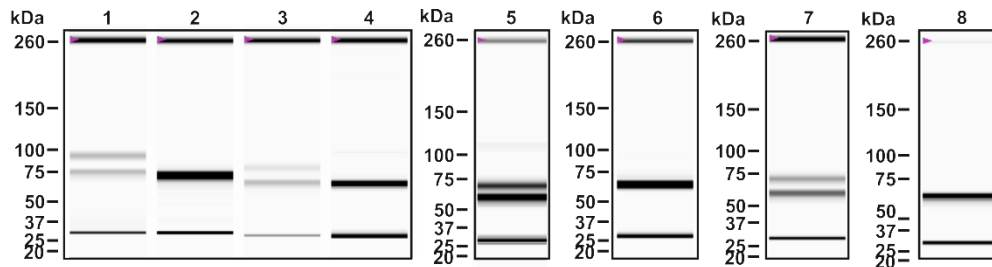


**Abbildung 22: Western Blot verschiedener Antikörperpräparationen.** Spur 1) IgA2STD, Spur 2) Ktrl.-IgA2wt, Spur 3) Ktrl.-IgA2.0, Spur 4) RTX-IgA2.0, Spur 5) RTX, Spur 6) Ofa-IgA2.0, Spur 7) Ofa, Spur 8) Obi-IgA2.0 und Spur 9) BHH2. Alle aufgetragenen Antikörper wurden unter denaturierenden und reduzierten Bedingungen per SDS PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. A Zur Detektion wurden ein Anti-Human IgA ( $\alpha$ -chain specific)-Peroxidase antibody produced in goat (Sigma-Aldrich Corporation, 1:10000) verwendet. B Zur Detektion diente hier ein Goat anti HU Kappa Chain:HRP Antikörper von BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH (Verdünnung 1:2500). Je Spur wurden 2  $\mu$ g eines jeden Antikörpers aufgetragen.

hin untersucht und zusätzlich deren Konzentration bestimmt. In Abbildung 21 sind Antikörperpräparationen aus einem transienten (HEK-Zell) Produktionssystem, in Abbildung 23 sind Antikörperpräparationen aus einem stabilen (CHO-K1) Produktionssystem unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen gezeigt. Die CD20 gerichteten IgG1 Antikörper (Abbildung 21 = Bande 2: RTX, Bande 4: Ofa, Bande 6: Obi, Bande 8: Ktrl.-IgG1; Abbildung 23 = Bande 2: Ktrl.-IgG1, Bande 4: RTX, Bande 6: Ofa, Bande 8: Obi) zeigen ein relativ einheitliches Laufmuster, bestehend aus einer Bande zwischen 50 kDa und 75 kDa, entsprechend der molekularen Masse der schweren Ketten, und einer Bande von knapp über 25 kDa, was der molekularen Masse der leichten Ketten entspricht. Wie bereits in der SDS PAGE gezeigt, detektiert das System für die aufgetragenen IgA Antikörper (Abbildung 21 = Bande 1: RTX-IgA2.0, Bande 3: Ofa-IgA2.0, Bande 5: Obi-IgA2.0, Bande 7: Ktrl.-IgA2.0; Abbildung 23 = Bande 1: Ktrl.-IgA2.0, Bande 3: RTX-IgA2.0, Bande 5: Ofa-IgA2.0, Bande 7: Obi-IgA2.0) eine Bande bei ca. 25 kDa. Auch die, bereits in der SDS PAGE und im Western Blot nachgewiesene Doppelbande der schweren Ketten der CD20-gerichteten IgA2.0 und Ktrl.-IgA2.0 Antikörper wird hier sichtbar. Anders jedoch als in der SDS-PAGE laufen die Banden für den



aufgetragenen Ktrl.-IgA2.0 deutlich höher (zwischen 70 und 100kDa) als die CD20-IgA2.0 Präparationen. Dieser Umstand könnte auf die unterschiedliche variable Region der schweren Kette des Kontrollantikörpers zurückzuführen sein, die im Gegensatz zu den anderen aufgetragenen Proben eine Glykosylierungsstelle besitzt. Während der Konzentrationsbestimmungen aller Antikörper fiel die teilweise erhebliche Diskrepanz der Werte auf, die durch unterschiedliche Messmethoden erhalten wurden. Deshalb wurden besonders bei hoch-



**Abbildung 23: Automatische Kapillarelektrophorese der CD20-gerichteten IgA2.0 mAk produziert in CHO-K1 Zellen sowie deren parentale IgG1 Antikörper und jeweilige Isotypkontrollen.** Alle Antikörperproben wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels der Experion Technologie aufgetrennt und analysiert. M=Marker, Spur 1) Ktrl.-IgA2.0, Spur 2) Ktrl.-IgG1, Spur 3) RTX-IgA2.0, Spur 4) RTX, Spur 5) Ofa-IgA2.0, Spur 6) Ofa, Spur 7) Obi-IgA2.0 und Spur 8) Obi

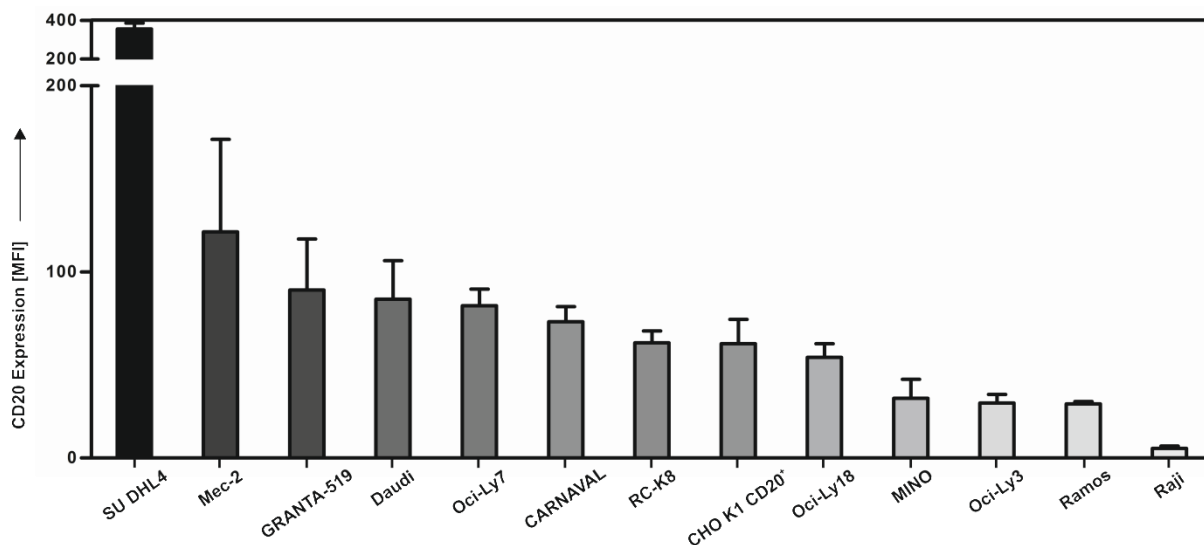
konzentrierten Antikörperproben entsprechende Verdünnungsstufen im Experion System vermessen, um eventuelle Unter- oder Überschätzungen in Bezug auf die vorhandene Menge der Antikörper zu vermeiden. In Bezug auf die von uns durchgeführten Qualitätskontrollen unterschieden sich Antikörperpräparationen aus verschiedenen Produktionssystemen (HEK vs. CHO-K1) nicht. Die Produktion der CD20-IgA2.0 Antikörper in einem transienten HEK-System oder in stabilen, antikörperproduzierenden CHO-K1 Zellklonen hat keinerlei Einfluss auf deren Verhalten in Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie, Laufeigenschaften in der SDS-PAGE, Western Blot und automatisierter Kapillarelektrophorese.

### 3.2 Funktionelle Charakterisierung der generierten CD20 gerichteten IgA Antikörper

Im nächsten Abschnitt sollen die generierten CD20 gerichteten IgA Antikörper in Bezug auf ihre funktionelle Aktivität überprüft werden. Dabei werden im ersten Abschnitt die Bindungseigenschaften sowohl an das Antigen CD20 als auch an Fc $\alpha$ RI untersucht. Weiterhin soll die Rekrutierung von PMN als Effektorzellen für den ADCC und auch die Aktivierung von CDC durch die IgA Antikörper analysiert werden. Besonders in Bezug auf die homotypische Aggregation und B-Zell-Depletion sollen die drei IgA Antikörper auch mit ihren parentalen IgG1 Antikörpern verglichen werden.



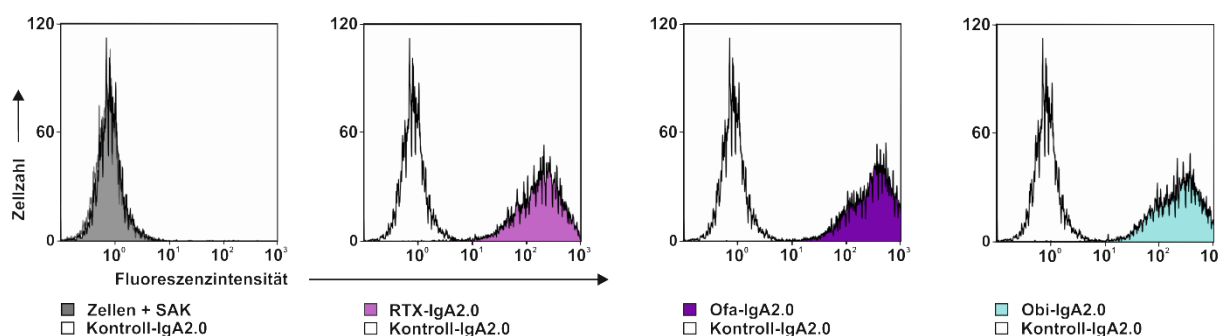
### 3.2.1 CD20 Expression aller in der Arbeit verwendeten Zelllinien



**Abbildung 24: CD20 Oberflächenexpression verschiedener Zelllinien.** Die CD20-Expression der Zellen wurde mittels direkter Immunfluoreszenz im Durchflusszytometer analysiert. Zum Färben wurden entweder ein spezifischer direkt gekoppelter CD20-FITC oder ein IgG(mouse)-FITC Antikörper (beide Beckman Coulter, Brea, CA) als Fluoreszenzkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Durchflusszytometrie. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) dreier unabhängiger Experimente.

Die Oberflächenexpression des CD20 Antigens wurde auf allen in der Arbeit verwendeten Zelllinien mittels direkter Immunfluoreszenz und durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen sind in Abbildung 24 gezeigt. Die Zelllinien zeigten unterschiedlich hohe Expressionen vom CD20-Molekül auf ihrer Oberfläche.

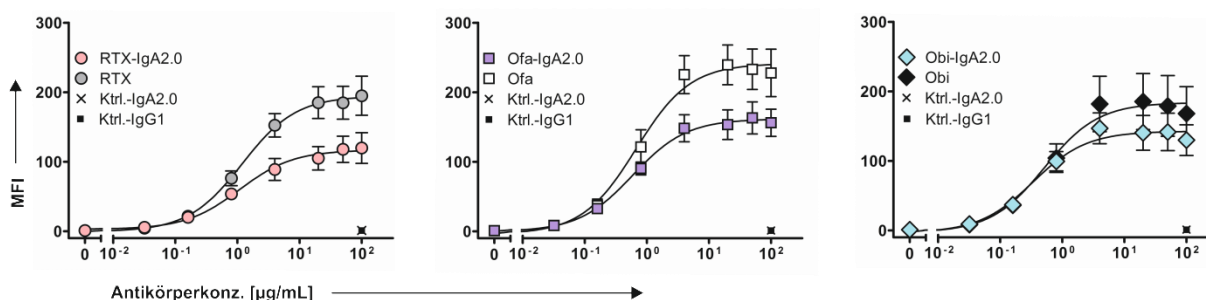
### 3.2.2. Bindung der CD20 gerichteten IgA Antikörper an CD20 exprimierende CHO K1 Zellen



**Abbildung 25: Bindung der Antikörper an humanes CD20 exprimierende CHO K1 Zellen.** Die Bindung von RTX-IgA2.0, Ofa-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 sowie eines unspezifischen Ktrl.-IgA2.0 Moleküls an CD20-exprimierende CHO-K1 Zellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. Dargestellt sind die Histogramme aus Zellzahl und Fluoreszenzintensität. Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind exemplarisch gezeigt. Sekundärantikörper= Ziege-Anti-Humane- $\kappa$  - Kette-FITC

Um die Funktionalität der CD20 gerichteten IgA Antikörper zu testen, wurde in einem ersten Schritt die Bindung der Antikörper an humanes CD20 exprimierende CHO K1 Zellen durchflusszytometrisch mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. In sättigenden Konzentrationen der eingesetzten CD20 gerichteten IgA Antikörper wurde eine spezifische Bindung auf den Zielzellen nachgewiesen

(Abbildung 25). Die im Versuch eingesetzte Isotypkontrolle zeigte keinerlei spezifische Bindung an die Zielzellen. Im nächsten Schritt wurden die CD20 exprimierenden CHO K1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationsreihen der spezifischen IgA und der jeweiligen parentalen CD20-gerichteten IgG1-



**Abbildung 26: Konzentrationsabhängige Bindung von CD20-gerichteten Antikörpern an CD20 exprimierende CHO K1 Zellen.** Die Bindung der verschiedenen CD20-IgA2.0 und- IgG1 Antikörper an das Antigen CD20 wurde per indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Standardfehlern von vier unabhängigen Experimenten. Jeweilige Kontrollantikörper zeigten keine spezifische Bindung an die Zielzellen. Sekundärantikörper= Ziege-Anti-Humane- $\kappa$ -Kette-FITC

Antikörpern inkubiert, um die konzentrationsabhängige Bindung und die Avidität der verschiedenen Antikörper zum Antigen zu ermitteln (Abbildung 26). Obwohl die MFI-Werte der IgG1 Antikörper in sättigenden Konzentrationen im Schnitt höher waren als die der jeweiligen IgA2.0 Antikörper (Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI): RTX-IgA2.0 =  $116,8 \pm 7,68$  vs. RTX =  $194,7 \pm 9,76$ ; Ofa-IgA2.0 =  $161,7 \pm 8,07$  vs. Ofa =  $241,8 \pm 12,68$ ; Obi-IgA2.0 =  $143 \pm 9,1$  vs. Obi =  $184,3 \pm 15,67$ ), zeigten sowohl parentale IgG1 als auch hergestellte IgA2.0 Antikörper ähnliche Avidität ( $EC_{50}$ -Werte, Tabelle 13) zum Antigen CD20. Jeweilige Isotypkontrollen zeigten auch in diesem Versuch keine spezifische Bindung an CD20 exprimierende CHO K1 Zellen. Im Vergleich der drei verschiedenen CD20 gerichteten IgA Antikörper untereinander zeigte sich, dass Ofa-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 im Vergleich zu dem RTX-IgA2.0 Molekül bereits in niedrigeren Konzentrationen signifikant besser an die Zielzellen banden. Sowohl Ofa-IgA2.0 als auch Obi-IgA2.0 unterschieden sich bei einer

**Tabelle 13:  $EC_{50}$  Werte verschiedener CD20-gerichteter Antikörper die aus Bindungsreihen auf CD20<sup>+</sup> CHO K1 Zellen errechnet wurden.**

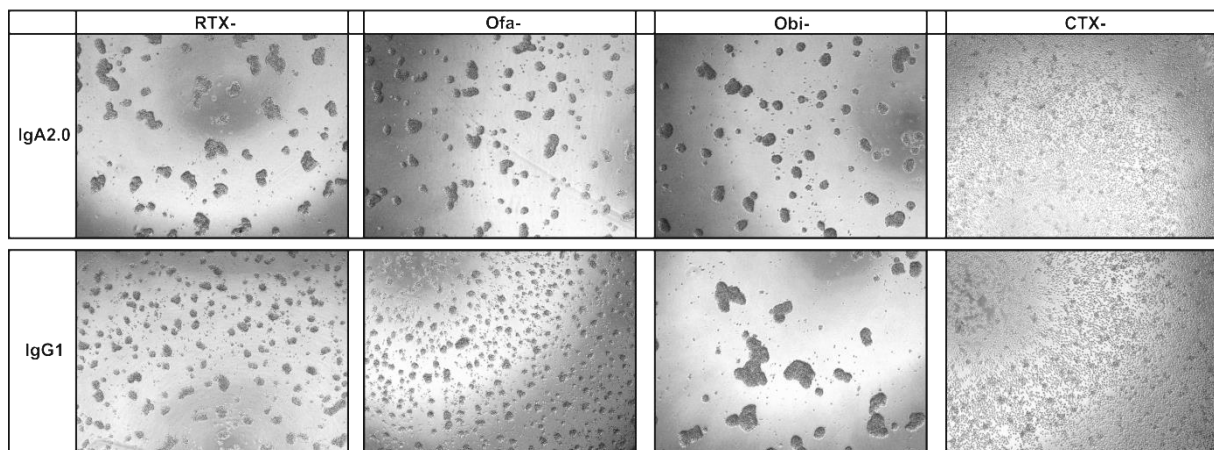
Antikörper	$EC_{50} \pm SEM$ [ $\mu g/mL$ ]
RTX-IgA2.0	$1,07 \pm 1,59$
Ofa-IgA2.0	$0,54 \pm 1,45$
Obi-IgA2.0	$0,35 \pm 1,65$
RTX	$1,19 \pm 1,48$
Ofa	$0,69 \pm 1,46$
Obi	$0,53 \pm 1,89$

Antikörperkonzentration von  $2 \mu g/mL$  mit einem -Wert von  $<0,001$  vom RTX-IgA2.0 signifikant.

### 3.2.3 Homotypische Aggregation

Die durch CD20-gerichteten Antikörper induzierte Zusammenballung (homotypische Aggregation) CD20 positiver B-Zellen (hier Tumorzelllinien gezeigt) führt zu einem programmierten Zelltodmechanismus in den Zellen, der als Caspase-unabhängig beschrieben ist und somit keine Apoptose darstellt. Im Folgenden wurden zunächst SU-DHL4 Zellen für insgesamt 24 h mit spezifischen CD20-gerichteten IgA2.0 und-IgG1 Antikörpern inkubiert und die Versuchsansätze zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Als Positivkontrolle wurde in diesen Versuchen

Zielzellen: SU-DHL4  
Inkubationszeit= 4 Stunden

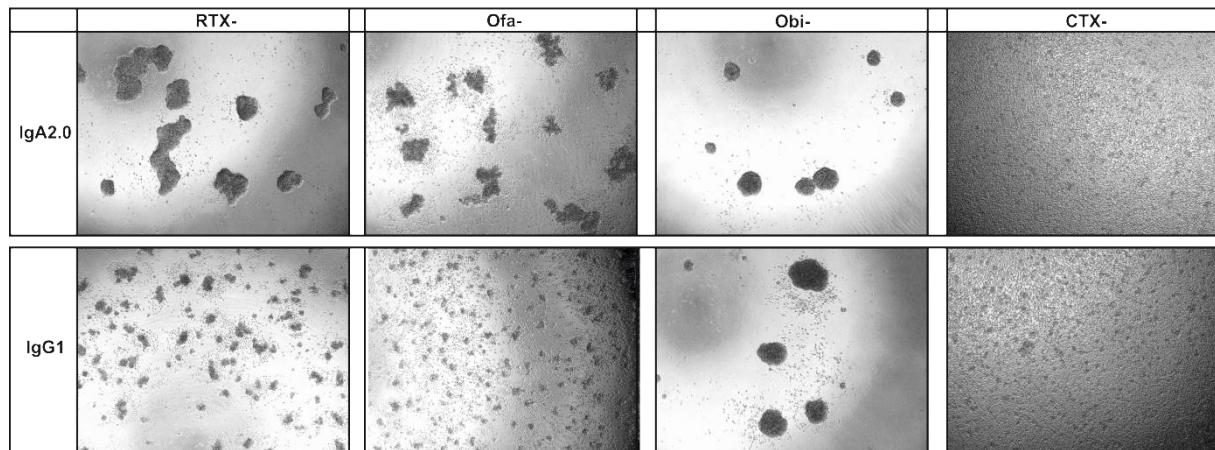


**Abbildung 27: Visuelle Darstellung der durch CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper induzierte homotypische Aggregation nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden.** Zielzellen:SU-DHL4. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,7 \times 10^6$  ausgesät und anschließend mit 10  $\mu\text{g/mL}$  der jeweiligen spezifischen Antikörper oder Kontrollantikörper inkubiert. Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind exemplarisch gezeigt. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten verifiziert.

Obinutuzumab eingesetzt. In Abbildung 27 sind alle Versuchsansätze nach einer Inkubationszeit von 4h dargestellt. Obinutuzumab induzierte eine deutliche Aggregation der hier gezeigten SU-DHL4 Zellen. Auch alle drei spezifischen CD20-gerichteten IgA Antikörper induzierten bereits nach 4 h eine deutlich sichtbare Veränderung in der Struktur der Zellpopulation. In den Versuchsansätzen der beiden CD20 gerichteten IgG1 Antikörper RTX- und Ofa sind ebenfalls kleinere Zellhaufen erkennbar, allerdings unterscheidet sich deren Struktur bereits nach 4 h schon deutlich von denen der Ansätze mit RTX-, Ofa- und Obi-IgA2.0 sowie Obi-IgG1. Im Vergleich zu ihren parentalen IgG1 Antikörpern vermitteln RTX- und Ofa-IgA2.0 optisch eine stärkere homotypische Aggregation der B-Zellen. Der Vergleich zwischen Obi-IgA2.0 und Obi-IgG1 zeigte, dass der IgG1 Antikörper deutlich stärker zur Zusammenballung der Zellen führte, während Obi-IgA2.0 behandelte Zellen einen ähnlichen Grad an Zellzusammenlagerung zeigten wie RTX- und Ofa-IgA2.0. Nach 24h zeigte sich, dass Obi-IgG1 die größte Strukturveränderung in der B-Zelllinie SU-DHL4 induzierte (Abbildung 28). Alle behandelten Zellen im Versuchsansatz waren zu 5 bis 6 großen Klumpen aggregiert und einzelne Zellen waren kaum zu finden. Auch Obi-IgA2.0 behandelte Zellen waren nach 24h zu mittelgroßen Zellhaufen assoziiert, die sich über das gesamte Sichtfeld verteilten. Ebenfalls waren hier kaum vereinzelte

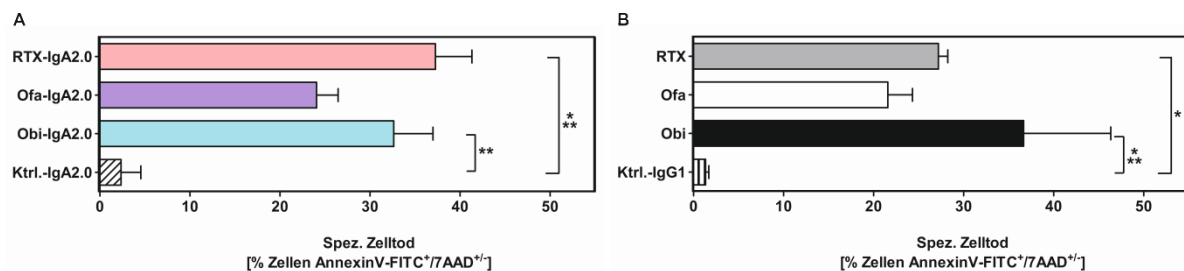
Zellen zu finden. Auch RTX-IgA2.0 und RTX-IgG1 induzierten optisch deutlich homotypische Aggregation der Zielzellen, wobei sich der IgA2.0 Antikörper hier als effektiver erwies als sein IgG1 Gegenstück. Den geringsten Grad der homotypischen Aggregation

Zielzellen: SU-DHL4  
Inkubationszeit= 24 Stunden



**Abbildung 28: Visuelle Darstellung der durch CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper induzierte homotypische Aggregation nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden.** Zielzellen: SU-DHL4. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,7 \times 10^6$  ausgesät und anschließend mit  $10 \mu\text{g/mL}$  der jeweiligen spezifischen Antikörper oder Kontrollantikörper inkubiert. Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind exemplarisch gezeigt. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten verifiziert.

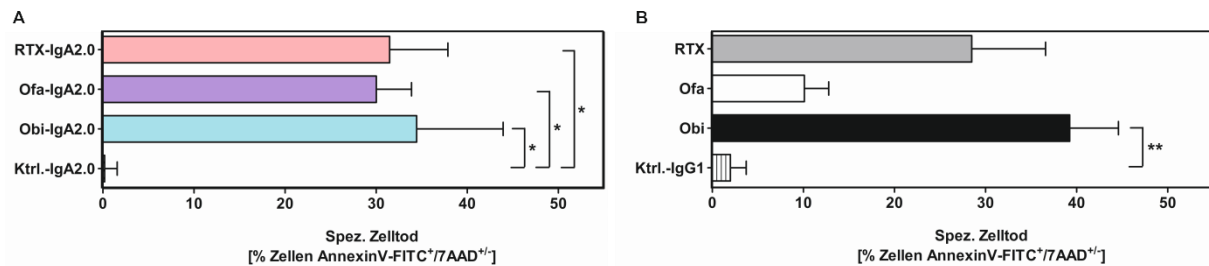
vermittelten Ofa-IgA2.0 und der dazugehörige parentale IgG1-Antikörper Ofa. Der IgG1 Antikörper zeigte nur eine kleine homogene Aggregatbildung und auch einzeln liegende Zellen waren im Versuchsansatz zu finden. Ofa-IgA2.0 war in der Lage, SU-DHL4 Zellen zu einem höheren Grad zu aggregieren, doch diese Zellansammlungen wirkten lose. Um die aggregierten Bereiche war ein Hof



**Abbildung 29: Durchflusszytometrische Bestimmung des spezifischen Zelltodes nach Antikörper-vermittelter Induktion der homotypischen Aggregation in SU-DHL4 Zellen.** Zielzellen: SU-DHL4. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,7 \times 10^6$  ausgesät und anschließend mit  $10 \mu\text{g/mL}$  der jeweiligen spezifischen Antikörper oder Kontrollantikörper inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden die behandelten Zellen geerntet und mit einem Annexin V-FITC/7-AAD Kit gefärbt. Aufgetragen ist der durch die Antikörper induzierte spezifische Zelltod der Zielzellen als [% Zellen AnnexinV-FITC<sup>pos</sup>/7-AAD<sup>pos/neg</sup>]. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ . One-Way-ANOVA mit Bonferroni-post-Test.

aus einer Vielzahl einzelner Zellen erkennbar. Um diese optischen Beobachtungen auch statistisch auswerten zu können, wurden die Versuchsansätze nach 24h vorsichtig resuspendiert, die Zellen mit AnnexinV-FITC und 7-AAD gefärbt und die Färbung im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht. Obwohl sich der Grad der Zusammenballung der Zielzellen durch die Behandlung mit verschiedenen CD20-IgA/IgG1-Antikörpern optisch deutlich unterschied, übersetzte sich diese Beobachtung nicht in

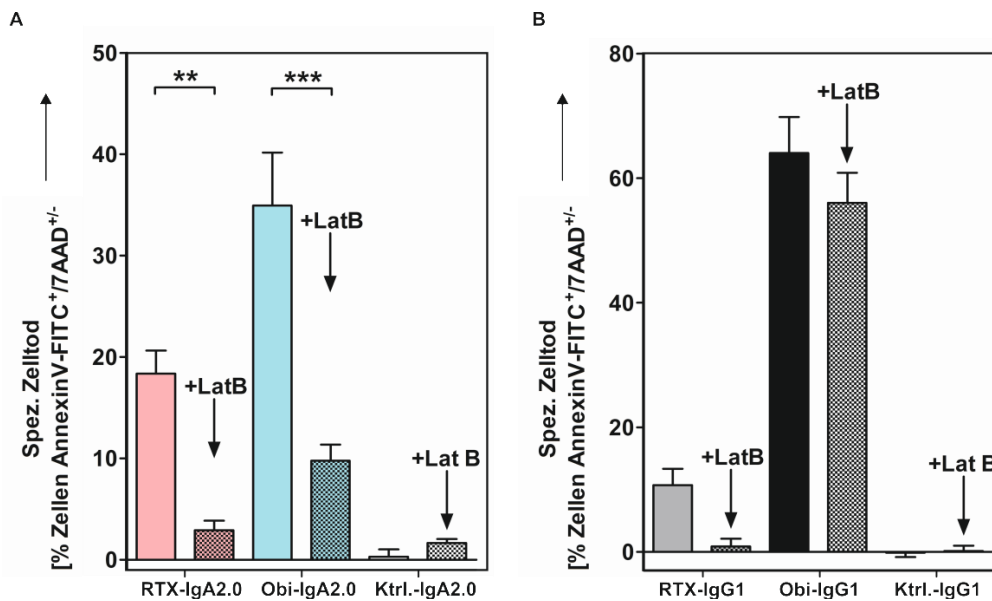
die durchflusszytometrischen Untersuchungen zu dem durch die Antikörper induzierten Zelltod. In Abbildung 29 sind die mit spezifischen – und Kontrollantikörper behandelten SU-DHL4-Zellen nach der durchflusszytometrischen Bestimmung des Zelltodes dargestellt. Die Induktion des spezifischen Zelltodes in SU-DHL4 Zellen durch CD20-IgA2.0 Antikörper unterschied sich nicht signifikant von dem, der durch CD20-IgG1 Antikörper induziert wurde. Für die anti-CD20-IgA2.0 Moleküle war der durch RTX-IgA2.0 induzierte Zelltod der SU-DHL4 Zellen signifikant am höchsten ( $37,3 \pm 4,05\%$  Zellen AnnexinV-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zu einem Kontrollmolekül (Abbildung 29A). Auch die



**Abbildung 30: Durchflusszytometrische Bestimmung des spezifischen Zelltodes nach Antikörper-vermittelter Induktion der homotypischen Aggregation in Daudi Zellen.** Zielzellen: Daudi. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,7 \times 10^6$  ausgesät und anschließend mit  $10 \mu\text{g/mL}$  der jeweiligen spezifischen Antikörper oder Kontrollantikörper inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden die behandelten Zellen geerntet und mit einem Annexin V-FITC/7-AAD Kit gefärbt. Aufgetragen ist der durch die Antikörper induzierte spezifische Zelltod der Zielzellen als [% Zellen AnnexinV-FITC<sup>pos</sup>/7-AAD<sup>pos/neg</sup>]. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05$  = \*,  $p < 0,01$  = \*\*,  $p < 0,001$  = \*\*\*. One-Way-ANOVA mit Bonferroni-post-Test.

durch Obi-IgA2.0 induzierte homotypische Aggregation war im Vergleich zu einem Ktrl.-IgA2.0 statistisch signifikant unterschiedlich ( $32,63 \pm 4,4\%$  Zellen AnnexinV-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>,  $p < 0,01$ ). Ofa-IgA2.0 war ebenso wie der parentale CD20-IgG1 Antikörper Ofa nicht signifikant effektiv im Vergleich zu einem jeweiligen Kontrollmolekül in diesem Versuchsaufbau. Alle Kontrollmoleküle erzeugten keinen spezifischen Zelltod in SU-DHL4 Zielzellen. Obi-IgG1 induzierte statistisch signifikant ( $36,7 \pm 9,7\%$  Zellen AnnexinV-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>,  $p < 0,001$ ) spezifischen Zelltod im Vergleich zu einem Ktrl.-IgG1 in diesem Versuchsablauf. Auch der durch RTX-IgG1 induzierte Zelltod war gegen einen Ktrl.-IgG1 Antikörper statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ). Nur der durch Ofa-IgG1 induzierte Zelltod war statistisch nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu dem durch den Ktrl.-IgG1 Antikörper induzierten Effekt (Abbildung 29 B). Während Obi der effektivste und RTX der zweiteffektivste unter den drei CD20-gerichteten Antikörpern darstellte, zeigte RTX-IgA2.0 eine höhere Effektivität als Obi-IgA2.0. Beide Ofa Varianten induzierten sowohl optisch als auch in den durchflusszytometrischen Untersuchungen die geringsten Raten homotypischer Aggregation/Zelltod. Um zu überprüfen, ob sich die Effektivität der Antikörper auch in anderen Zelllinien widerspiegelt, wurden zusätzlich Daudi Zellen in FACS Analysen zum spezifischen Zelltod untersucht. Alle drei CD20 gerichteten IgA Antikörper signifikanten Zelltod ( $P < 0,05$ ) induzierten (% AnnexinV-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> Zellen wurden für RTX-IgA2.0<sub>max</sub> zu  $31,48 \pm 6,39\%$ , für Ofa-IgA2.0<sub>max</sub> zu  $30,01 \pm 3,9\%$  und für Obi-IgA2.0<sub>max</sub> zu  $34,4 \pm 9,5\%$  bestimmt, Abbildung 30). Für die untersuchten CD20-gerichteten IgG1-Antikörper induzierte Obi-

IgG1 im Vergleich zu einem Ktrl.-IgG1 Molekül signifikant Zelltod der Daudi Zellen ( $\text{Obi}_{\text{max}}$ :  $39,24 \pm 5,35\%$  Zellen AnnexinV-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>;  $p < 0,01$ ). Anders jedoch als bei SU-DHL4 Zellen



**Abbildung 31: Durchflusszytometrische Bestimmung des spezifischen Zelltodes nach Antikörper-vermittelter Induktion der homotypischen Aggregation in SU-DHL4 Zellen nach der Inkubation mit Latrunculin B.** Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,7 \times 10^6$  ausgesät und anschließend mit 10  $\mu\text{M}$  Latrunculin B oder einer Ethanolkontrolle für 30 Minuten vorinkubiert. Alle CD20-gerichteten Antikörper oder Kontrollantikörper wurden im Anschluß in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/mL}$  eingesetzt. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit wurden die behandelten Zellen geerntet und mit einem Annexin V-FITC/7-AAD Kit gefärbt. Aufgetragen ist der durch die Antikörper induzierte spezifische Zelltod der Zielzellen als [% Zellen AnnexinV-FITC<sup>pos</sup>/7-AAD<sup>pos/neg</sup>]. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ . One-Way-ANOVA mit Bonferroni-post-Test.

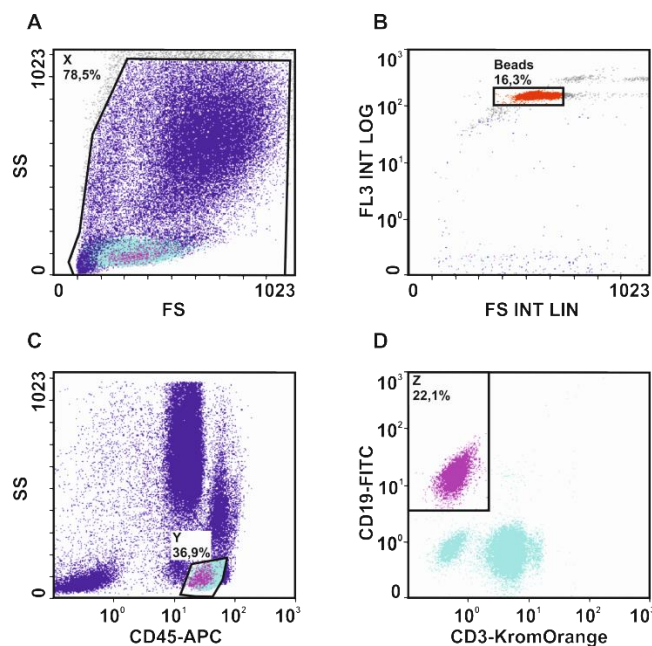
induzierten RTX und Ofa Zelltod der Daudi-Zielzellen, allerdings wurde eine statistische Signifikanz nicht erreicht. Für die durch CD20-gerichtete Antikörper induzierte homotypische Aggregation als auch PCD ist eine Reorganisation des Aktinskeletts der B-Zelle ausschlaggebend. Wurden Zielzellen mit dem Inhibitor Latrunculin B behandelt, der die Polymerisierung von Aktin inhibiert, konnte die CD20-mAb induzierte homotypische Aggregation und PCD verhindert werden (Ivanov *et al*, 2009). Dafür wurden in unserem Versuchsaufbau SU-DHL4-Zielzellen vor der Behandlung mit den spezifischen CD20-gerichteten IgA/IgG Antikörpern mit Latrunculin B vorinkubiert, um die antikörperinduzierte Reorganisation des Aktinskeletts zu unterbinden. Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Auswertung des durch die Antikörper induzierten PCD zeigen deutlich, dass sowohl der von RTX-IgA2.0 als auch von Obi-IgA2.0 induzierte PCD der Zielzellen durch eine Behandlung mit Latrunculin B signifikant inhibiert werden konnte (Abbildung 31A). Der durch die parentalen CD20-gerichteten Antikörper RTX-IgG1 und Obi-IgG1 induzierte Zelltod konnte durch die Behandlung der Zellen mit Latrunculin B zwar vermindert werden, allerdings war die Inhibition bei beiden Antikörpern statistisch nicht signifikant (Abbildung 31B). Zusätzlich wurde im selben Versuchsaufbau auch der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK eingesetzt, um auszuschließen, dass es sich bei dem von den Antikörpern induzierten Zelltod um Apoptose handelt. Der Einsatz des Inhibitors Z-VAD-FMK konnte



den durch die spezifischen CD20-gerichteten Antikörper induzierten PCD nicht inhibieren (Siehe Anhang, Abbildung 54).

### 3.2.4 B-Zell-Depletion

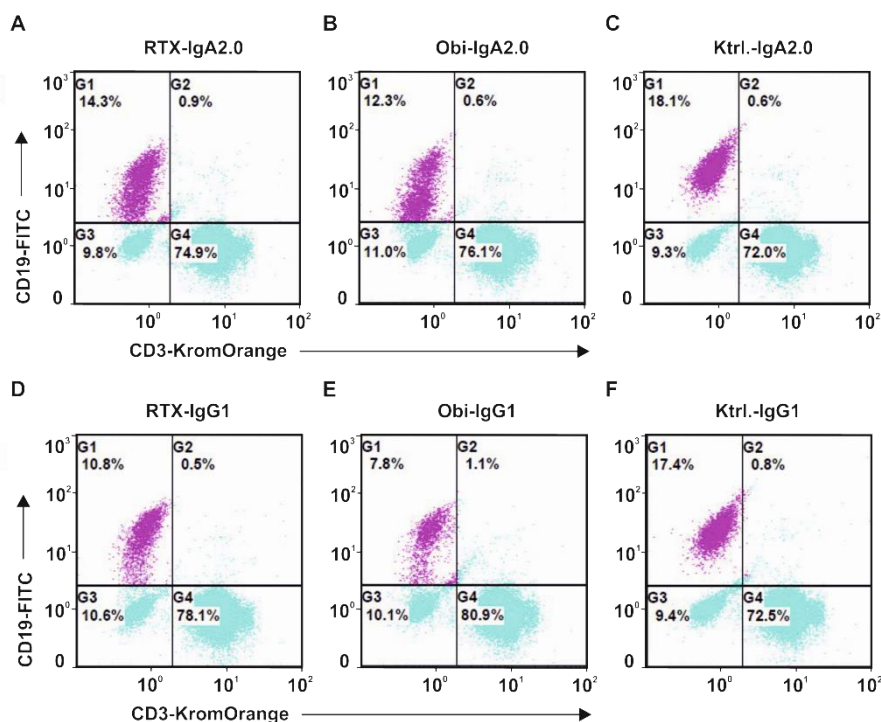
CD20 gerichtete Antikörper können im Vollblut die B-Zellen depletieren, die das Antigen CD20 exprimieren. Um die Fähigkeit der B-Zell-Depletion der neu generierten CD20-gerichteten IgA Antikörper untersuchen zu können, wurden jeweils spezifische CD20-gerichtete IgA2.0 und deren parentale IgG1 Antikörper sowie jeweilige Kontrollmoleküle mit Vollblut von gesunden, freiwilligen Spendern inkubiert. Anschließend wurde mit verschiedenen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern



**Abbildung 32: Gating-Strategie in Vollblut B-Zell-Depletionsversuchen.** In A ist der Versuchsansatz in der Durchflusszytometrie gezeigt, wobei der SS gegen den FS aufgetragen ist. In B gezeigt: Die in Analysefenster X enthaltenen beads (Flow-Check™ Fluorospheres) sind im FL3 Kanal nachweisbar, der gegen den FS aufgetragen ist. In C: alle in Analysefenster X erfassten Zellen wurden bzgl. ihrer CD45-Expression untersucht. In D wurden alle Zellen aus Analysefenster Y bzgl. ihrer CD19 und CD3-Expression untersucht. Die Abnahme der B-Zellen durch die Behandlung mit CD20-Antikörpern wurde durch die prozentuale Veränderung der gezählten Ereignisse in Analysefenster Z definiert.

die Anzahl residueller B-Zellen bestimmt. In Abbildung 32 ist die *gating*-Strategie für die folgenden Ergebnisse gezeigt. Alle im Analysefenster „X“ liegenden Zellen in Abbildung 32A wurden für weitere Auswertungen untersucht. In Abbildung 32B sind die *beads* (Flow-Check™ Fluorospheres) gezeigt deren Signal im FL3 Kanal erscheint und dieses gegen den FS aufgetragen wurde. Anschließend wurde die CD45<sup>pos</sup> Zellpopulation durch das Analysefenster „Y“ festgelegt (Abbildung 32) und alle Zellen, die sich in diesem Analysefenster befanden anhand der CD19-FITC und CD3-KromOrange Signale (Abbildung 32D) begutachtet. In Abbildung 33 ist die Verschiebung der CD19<sup>pos</sup>-B-Zellpopulation gezeigt (in Analysefenster G1), die in Abhängigkeit des verwendeten CD20-gerichteten Antikörpers unterschiedlich stark auftrat. Während die Zellpopulation eines mit einem Kontrollantikörper behandelten Ansatzes (Abbildung 33C und F) ein stark positives CD19-Signal

abbildet, nimmt die Stärke des CD19-Signals der gesamten Population bspw. in Zusammenhang mit



**Abbildung 33: Die Verschiebung der CD19<sup>pos</sup>-B-Zellpopulation nach CD20-Antikörperbehandlung.** Die B-Zellen des Vollbluts gesunder Spender zeigen nach der Behandlung mit CD20-Antikörpern vom IgA2.0 und IgG1 Isotyp einen Verlust des Marker-Antigens CD19. Während B-Zellen im mit Ktrl.-Antikörpern behandelten Vollblut stark positive CD19-Signale abbildeten, nahmen die gemessenen CD19-Signale der B-Zellen des Vollblutes nach der Inkubation mit CD20-Antikörpern unterschiedlich stark ab. Von der Verschiebung der CD19-Zellpopulation waren CD20-gerichtete IgA2.0 Antikörper stärker betroffen (A+B) als ihre parentalen IgG1 Antikörper (D+E). Der Verlust des Nachweisantigens CD19 von der Oberfläche der B-Zellen kann mit einer verfälschten Interpretation der Untersuchungsergebnisse einhergehen, wenn bspw. B-Zellen, die in Folge der Antikörperbehandlung zwar CD19<sup>neg</sup> in der Durchflusszytometrie erscheinen (und somit als depletiert analysiert wurden), durch die Antikörperbehandlung tatsächlich jedoch nicht depletiert wurden.

der Inkubation von RTX- und Obi-IgA2.0 (Abbildung 33A und B) ab. In Abbildung 34 ist die konzentrationsabhängige, durch anti-CD20-IgA2.0 und -IgG1 induzierte Depletion von B-Zellen aus humanem Vollblut gezeigt. Dabei sind jeweils die Antikörper RTX-IgA2.0 und RTX-IgG1 sowie Obi-IgA2.0 und Obi zusammen mit je zwei unspezifischen Kontrollantikörpern dargestellt.

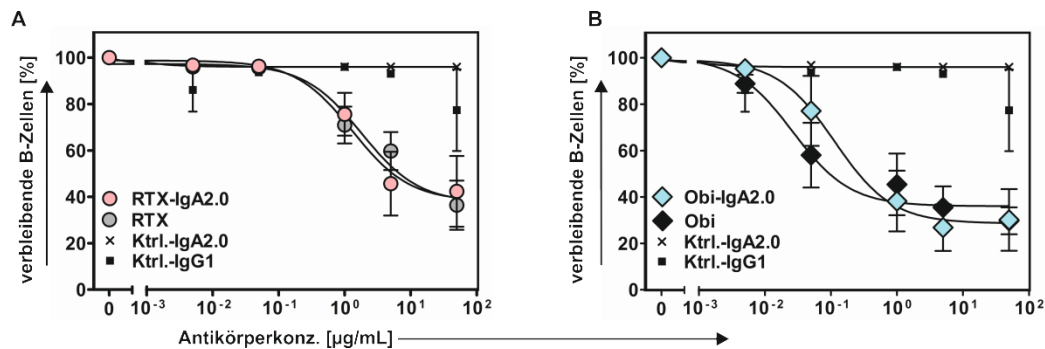
**Tabelle 14: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und errechnete EC<sub>50</sub>-Werte sowie die Werte der maximalen B-Zell-Depletion aus Vollblutversuchen.**

Antikörper	EC <sub>50</sub> ± SEM [µg/mL]	Depletierte B-Zellen <sub>max</sub> [%]
RTX-IgA2.0	1,30 ± 1,94	57,65±15,26
RTX	1,81 ± 1,65	63,58±10,92
Obi-IgA2.0	0,11 ± 2,15	69,88±13,3
Obi	0,026 ± 1,98	70,28±5,79

In Abbildung 34A induzierten sowohl RTX-IgA2.0 als auch RTX gleichermaßen eine statistisch signifikante Verringerung der B-Zellen in diesen Vollblutversuchen. Die EC<sub>50</sub>-Werte aller eingesetzten CD20-gerichteten Antikörper sowie die Werte der durch CD20-gerichtete Antikörper induzierte

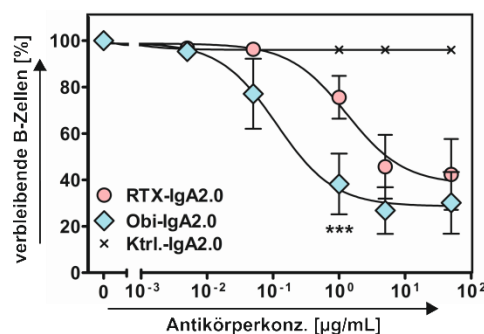


maximale prozentuale B-Zelldepletion sind in Tabelle 14 angegeben. Die Kurven von RTX-IgA2.0 und RTX verlaufen dabei nahezu identisch und unterscheiden sich statistisch nicht signifikant. Beide Kontrollmoleküle induzieren keine statistisch signifikante B-Zell-Depletion. In Abbildung 34B ist der Vergleich von Obi-IgA2.0 und Obi dargestellt. Wie in Abbildung 34A sind auch hier beide spezifischen



**Abbildung 34: Die konzentrationsabhängige, durch anti-CD20-IgA2.0 und -IgG1 induzierte Depletion von B-Zellen aus humanem Vollblut.** Vollblut gesunder Spender wurde mit verschiedenen CD20-Antikörpern für 24 h inkubiert. Die Depletion der B-Zellen wurde durchflusszytometrisch unter der Nutzung von verschiedenen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern untersucht (spezifisch für CD45, CD19, und CD3). In A ist die durch RTX-IgA2.0 und RTX-IgG1 induzierte B-Zelldepletion nach 24 h gezeigt. In B ist die durch Obi-IgA2.0 und Obi-IgG1 induzierte B-Zelldepletion nach 24 h gezeigt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil residueller B Zellen in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration der spezifischen CD20-Antikörper. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente.

CD20-Antikörper in der Lage, in gleichem Maße (nicht statistisch signifikant unterschiedlich) B-Zellen aus humanem Vollblut zu depletieren, wobei sie sich von eingesetzten Kontrollmolekülen statistisch signifikant unterscheiden. In allen Versuchen induzierten die Kontrollmoleküle keine statistisch signifikante B-Zell-Depletion. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich die beiden anti-CD20-IgA2.0 Moleküle in ihrer Fähigkeit B-Zell-Depletion zu vermitteln statistisch signifikant voneinander unterscheiden (Abbildung 35,  $p=0,001$ ). Dabei

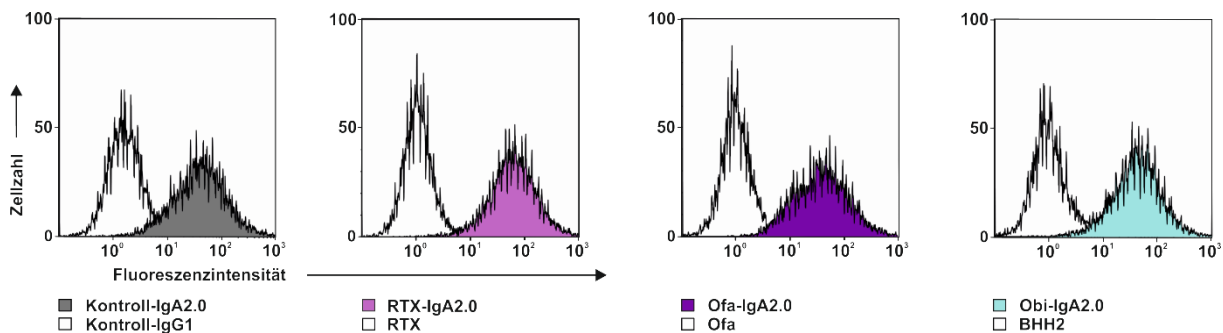


**Abbildung 35: Die konzentrationsabhängige, durch anti-CD20-IgA2.0 induzierte Depletion von B-Zellen aus humanem Vollblut.** Vollblut gesunder Spender wurde mit RTX-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 sowie einem Ktrl.-IgA2.0 für 24 h inkubiert. Die Depletion der B-Zellen wurde durchflusszytometrisch unter der Nutzung von verschiedenen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern untersucht (spezifisch für CD45, CD19, und CD3). Dargestellt ist der prozentuale Anteil residueller B Zellen in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration der spezifischen CD20-Antikörper. Bei einer Antikörperkonz. von 0,5 µg/mL depletierte Obi-IgA2.0 statistisch signifikant effektiver B-Zellen aus humanem Vollblut im Vergleich zu RTX-IgA2.0 in diesem Versuchsablauf. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente.  $p<0,001 = ***$ . Two-Way-ANOVA mit Bonferroni-post-Test.

unterschied sich Obi-IgA2.0 in der Konzentration von 0,5 µg/mL statistisch signifikant vom RTX-IgA2.0 Molekül und war in diesem Versuchsablauf der effektivere der beiden IgA2.0 Antikörper.

### 3.2.5 Bindung der CD20 gerichteten IgA Antikörper an FcαRI exprimierende BHK Zellen

IgA Antikörper binden an FcαRI/CD89. Um die Funktionalität der CD20 gerichteten IgA Antikörper zu testen, wurde die Bindung der Antikörper an BHK Zellen, die stabil mit Expressionsvektoren für FcαRI und FcεRIgamma transfiziert wurden, durchflusszytometrisch mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Die im Versuch eingesetzten Kontrollen sind jeweils die IgG1 Antikörper, die dieselben



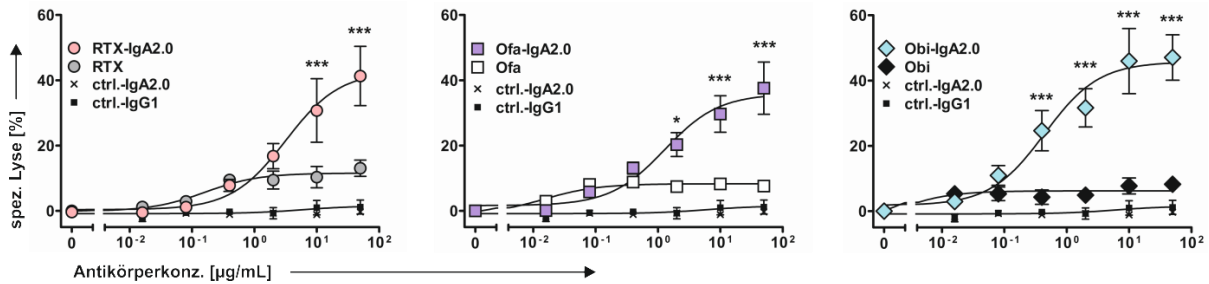
**Abbildung 36: Bindung der Antikörper an humanes FcαRI (CD89) exprimierende BHK-Zellen.** Die Bindung von RTX-IgA2.0, Ofa-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 sowie eines unspezifischen Ktrl.-IgA2.0 Moleküls an FcαRI -exprimierende BHK-Zellen wurde bei konstanter Antikörperkonzentration (1mg/mL) und mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. Dargestellt sind die Histogramme aus Zellzahl und Fluoreszenzintensität. Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind exemplarisch gezeigt. Sekundärantikörper = Ziege-Anti-Humane-κ-Kette-FITC

variablen Regionen tragen, wie die der hergestellten IgA2.0 Antikörper (RTX-IgA2.0 vs. RTX, Ofa-IgA2.0 vs. Ofa, Obi IgA2.0 vs. Obi sowie die Kontrollantikörper Ktrl.-IgA2.0 vs. Ktrl.-IgG1). Während alle hier verwendeten IgG1 Antikörper keine spezifische Bindung auf der transgenen Zelllinie zeigten, konnte für alle eingesetzten IgA2.0 Antikörper eine spezifische Bindung an FcαRI nachgewiesen werden (Abbildung 36). Alle verwendeten Antikörper wurden in sättigenden Konzentrationen eingesetzt (hier 1000 µg/mL).

### 3.2.6 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

#### 3.2.6.1 Unstimulierte PMN als Effektorzellen für IgA vermittelte ADCC

Mit ihrem Fc-Teil können IgA Antikörper FcαRI binden, der auf verschiedenen Immunzellen exprimiert wird. Damit können Effektorzellen wie z.B. PMN aktiviert und so ADCC in verschiedenen Zielzellen vermittelt werden. So konnten die hergestellten CD20-IgA2.0 Antikörper in <sup>51</sup>Chromfreisetzungsvorsuchen PMN als Effektorzellen zur Tumorzelllyse (hier in diesem Fall SU-DHL4 Zellen) rekrutieren (Abbildung 37). Das Effektor-zu-Tumorzell-Verhältnis (E:T-Verhältnis) betrug in diesen Versuchsanordnungen 80:1. Obi-IgA2.0 konnte mit 45,74±3,93% die höchste maximale spezifischen Lyserate der SU-DHL4 Zielzellen in diesem Versuchsablauf induzieren. RTX-IgA2.0 und Ofa-IgA2.0 waren dabei mit jeweils 42,72±5,47% und 35,87±3,45% maximaler spezifischer Lyse etwas weniger effektiv. Alle drei anti-CD20-IgA2.0 Moleküle induzieren statistisch signifikant höhere Lyse gegenüber ihren jeweiligen IgG1 Antikörpervarianten (siehe \* Abbildung 37). Für alle irrelevanten



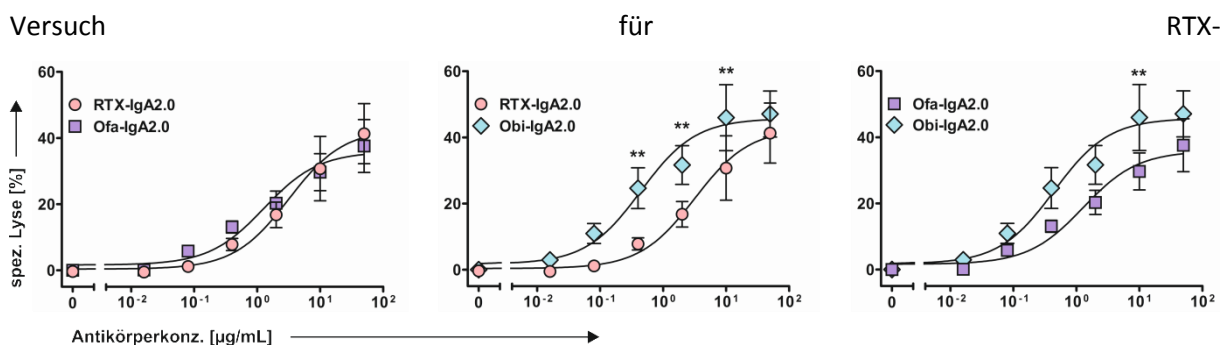
**Abbildung 37: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig PMN vermittelte ADCC gegen SU-DHL4 Zielzellen zu induzieren.** ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMN gesunder Spender in <sup>51</sup>Chromfreisetzungsversuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben: p<0,05 = \*, p<0,01 = \*\*, p<0,001 = \*\*\*. Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

Kontrollmoleküle war keine statistisch signifikante ADCC nachweisbar. Im direkten Vergleich der drei

**Tabelle 15: Mittlere effektive Konzentrationen von CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörpern in ADCC Versuchen mit SU-DHL4 Zielzellen und GM-CSF-stimulierten PMN als Effektorzellen.**

Antikörper	EC <sub>50</sub> ± SEM [µg/mL]
Obi-IgA2.0	0,44 ± 1,72
Ofa-IgA2.0	1,28 ± 1,68
RTX-IgA2.0	3,17 ± 1,76

CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörper wird deutlich, dass Obi-IgA2.0 sowohl gegen RTX-IgA2.0 als auch gegen Ofa-IgA2.0 statistisch signifikant höhere PMN-vermittelte Tumorzelllyse induziert (Abbildung 38). Die mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) ist für Obi-IgA2.0 am geringsten (0,44±1,72µg/mL) und steigt dann für Ofa-IgA2.0 auf 1,28±1,68µg/mL an. Die höchsten EC<sub>50</sub>-Werte werden in diesem Versuch

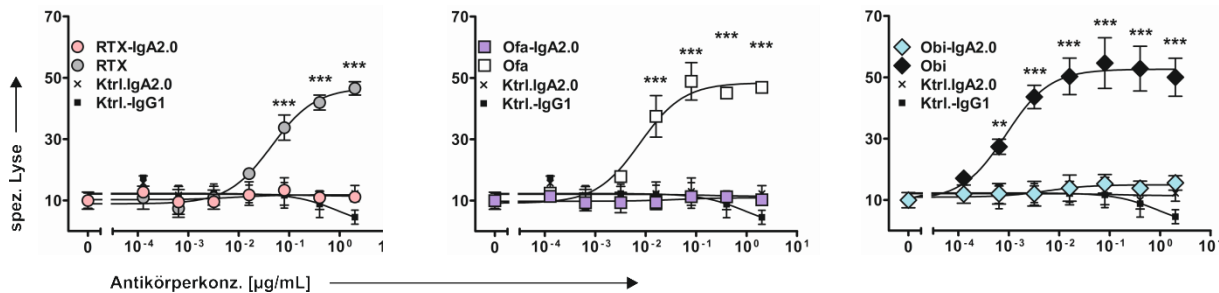


**Abbildung 38 : CD20-gerichtete IgA2.0 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig PMN vermittelte ADCC gegen SU-DHL4 Zielzellen zu induzieren.** ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMN gesunder Spender in <sup>51</sup>Chromfreisetzungsversuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben: p<0,05 = \*, p<0,01 = \*\*, p<0,001 = \*\*\*. Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

IgA2.0 gemessen (3,17 ± 1,76µg/mL) (siehe auch: Tabelle 15) der damit von den drei untersuchten IgA2.0 Antikörpern am wenigsten effektiv PMN vermittelte ADCC induzierte.

### 3.2.6.2 MNC als Effektorzellen für anti-CD20-IgG1 vermittelte ADCC

Während IgA Antikörper mit ihrem Fc-Teil an den IgA spezifischen FcαRI auf Effektorzellen binden und diese damit bspw. für ADCC rekrutieren können, wirken die parentalen CD20-gerichteten Antikörper vom IgG1 Isotyp (RTX, Ofa und Obi) über verschiedene FcγR. Therapeutische IgG1 Antikörper in der Tumorthherapie können erwiesenermaßen über diese FcγR ebenfalls verschiedene Effektorzellpopulationen (besonders NK-Zellen) für ADCC rekrutieren. Im letzten Abschnitt konnten die Ergebnisse deutlich zeigen, dass PMN als Effektoren für IgA induzierten ADCC äußerst effektiv Tumorzellen lysieren können, während IgG1 Antikörper im selben Versuch keinerlei statistisch



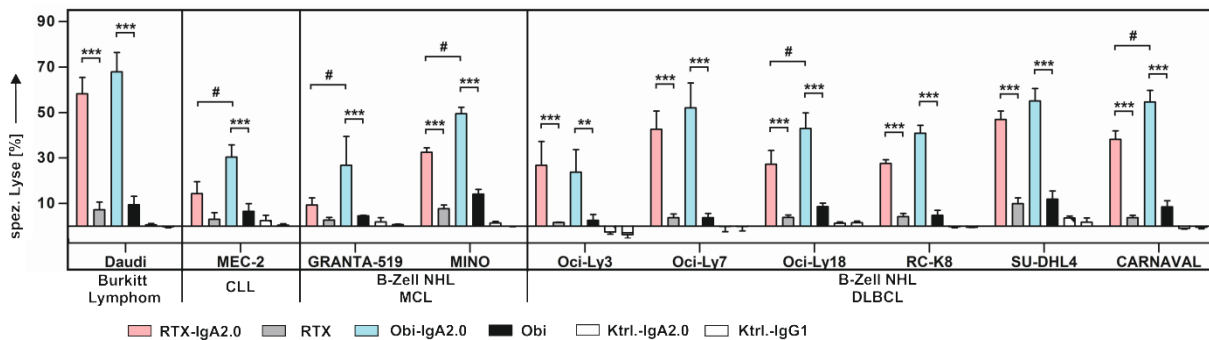
**Abbildung 39: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig MNC vermittelte ADCC gegen SU-DHL4 Zielzellen zu induzieren.** ADCC-Versuche wurden mit präparierten MNCs gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 40:1. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

signifikante Lyse induzierten. Im Folgenden wurden nun MNCs gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen als Effektoren in einem E:T-Verhältnis von 40:1 gegen SU-DHL4 Zellen eingesetzt, um die Wirksamkeit der CD20-IgG1 Antikörper in diesem Kontrollversuch zu bestätigen. RTX, Ofa und Obi induzieren in diesen Versuchen statistisch signifikante Lyse der SU-DHL4 Zellen, wobei Obi hier der effektivste Antikörper war. RTX-, Ofa- und Obi-IgA2.0 konnten mit MNC-Effektorzellen keinerlei spezifische Lyse vermitteln. Sowohl Ktrl.-IgG1 und Ktrl.-IgA2.0 induzieren keinerlei statistisch signifikante ADCC in der untersuchten Tumorzelllinie.

### 3.2.6.3 GM-CSF stimulierte PMN als Effektorzellen für IgA vermittelte ADCC

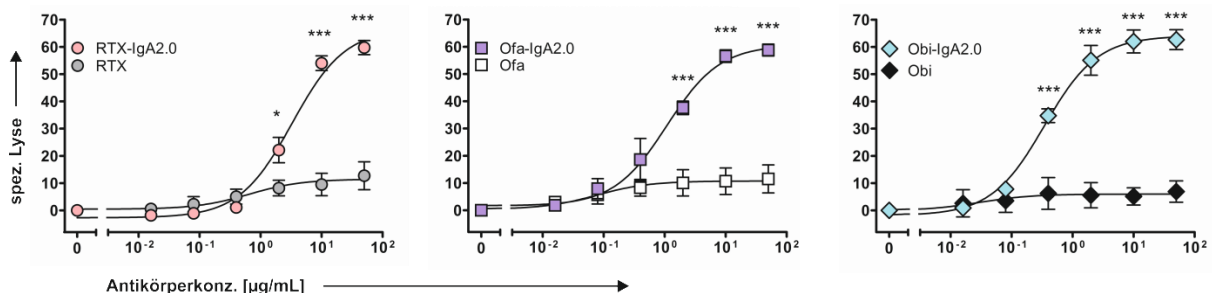
Um das volle Potential verwendeter Effektorzellpopulationen untersuchen zu können, wurden für die folgenden Versuche PMNs mit GM-CSF stimuliert. Mit einem E:T-Verhältnis von 80:1 und konstanten, sättigenden Konzentrationen spezifischer Antikörper (50  $\mu$ g/mL) wurden dann  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen mit verschiedenen CD20<sup>pos</sup> Tumorzelllinien durchgeführt. Obwohl sich die verwendeten Tumorzelllinien (siehe Tabelle 6) in Zelltyp und in ihren beschriebenen Oberflächenantigenen unterschieden (wie der Expression des Zielantigens CD20, siehe Abbildung 24), konnten RTX-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 statistisch signifikant Lyse in den Zielzellen induzieren (Abbildung 40). Während die parentalen IgG1 Antikörper (hier RTX und Obi) nicht PMN als Effektorzellen zur ADCC rekrutieren konnten waren beide CD20 gerichteten IgA2.0 Antikörper effektiv. Die höchsten

Lyseraten wurden dabei mit den Linien Daudi, SU-DHL4 und CARNAVAL gemessen. Die einzige



**Abbildung 40: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit, GM-CSF stimulierte PMN als Effektorzellen für ADCC gegen verschiedene Zielzelllinien zu rekrutieren.** ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMNs gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsversuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Konzentration der spez. - und Kontrollantikörper = 50  $\mu$ g/mL. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05$  = \*,  $p < 0,01$  = \*\*,  $p < 0,001$  = \*\*\*. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen RTX-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 sind mit # ( $p < 0,05$ ) angegeben. Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

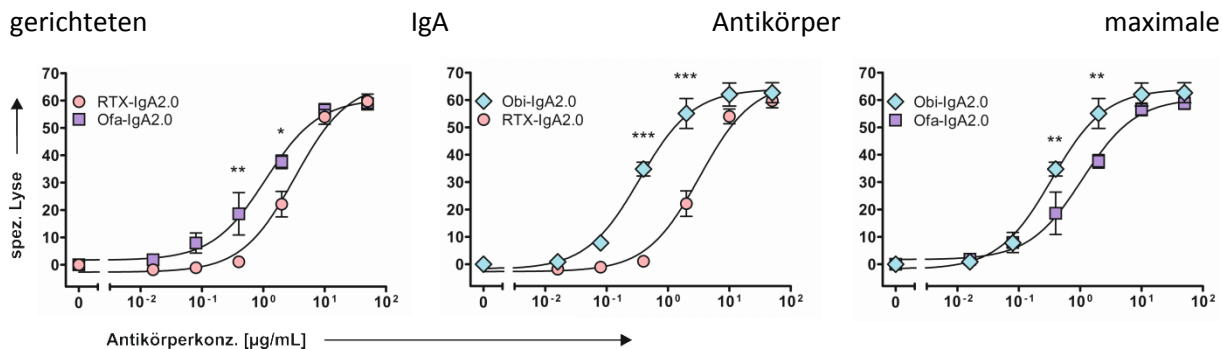
Zelllinie, bei der RTX-IgA2.0 im Vergleich zu RTX keine statistisch signifikant unterschiedliche Lyse induzierte, war die Linie GRANTA-519. Der Vergleich zwischen RTX-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 zeigte, dass sich besonders bei Zelllinien, in denen keine hohen Lyseraten beobachtet werden konnten, beide IgA2.0 Antikörper statistisch signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 40). Während sich die spezifische IgA induzierte Lyse in Zielzellen mit hohen Lyseraten wie Daudi oder SU-DHL4 nicht



**Abbildung 41: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig PMN (GM-CSF stimuliert) vermittelte ADCC gegen Daudi Zielzellen zu induzieren.** Zielzellen: Daudi. ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMN gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsversuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05$  = \*,  $p < 0,01$  = \*\*,  $p < 0,001$  = \*\*\*. Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

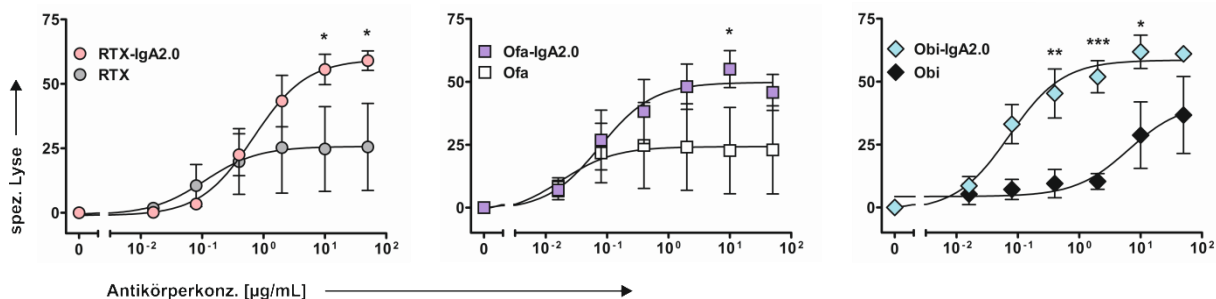
unterschied, war die in den Zelllinien MEC-2, GRANTA-519, MINO, CARNAVAL und Oci-Ly18 durch die verschiedenen spezifischen IgA2.0 Antikörper induzierte Lyse statistisch signifikant unterschiedlich. Dabei zeigte der Obi-IgA2.0 eine dem RTX-IgA2.0 überlegene zytotoxische Aktivität (Abbildung 40, hier #,  $p < 0,05$ ). Anschließend an diese ersten Untersuchungen der ADCC Aktivität der verschiedenen CD20 gerichteten IgA Antikörper wurden sowohl Daudi als auch SU-DHL4 Zellen in Dosis-Wirkungskurven mit GM-CSF stimulierten PMN untersucht. Daudi Zielzellen konnten sowohl mit RTX-IgA2.0 als auch Ofa-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 statistisch signifikante Lyse mit PMN als Effektorzellen im Vergleich zu ihren jeweiligen parental IgG1 (hier RTX, Ofa und Obi) induzieren

(Abbildung 41). Während die CD20 gerichteten IgG1 Antikörper eine Höchstaktivität von  $< 12\%$  (spez. Lyse in %; RTX:  $11,46 \pm 2,18$ ; Ofa:  $10,74 \pm 1,95$ ; Obi:  $5,98 \pm 2$ ) zeigten, induzierten die drei CD20 gerichteten



**Abbildung 42: Vergleich dreier CD20-gerichteter IgA2.0 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig PMN (GM-CSF stimuliert) vermittelte ADCC gegen Daudi Zielzellen zu induzieren.** Zielzellen: Daudi. ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMN gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

Lyseraten von bis zu 66% (spez. Lyse in %; RTX-IgA2.0:  $66,66 \pm 3,05$ ; Obi-IgA2.0:  $64,05 \pm 2,07$ ; Ofa-IgA2.0:  $60,64 \pm 2,91$ ). Obwohl sich die maximalen Lyseraten der unterschiedlichen CD20-IgA2.0 Antikörper in sättigenden Konzentrationen ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) nicht unterschieden, konnten in Verdünnungsstudien konzentrationsabhängig statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden. Während der Ofa-IgA2.0 bei geringeren Antikörperkonzentrationen eine statistisch

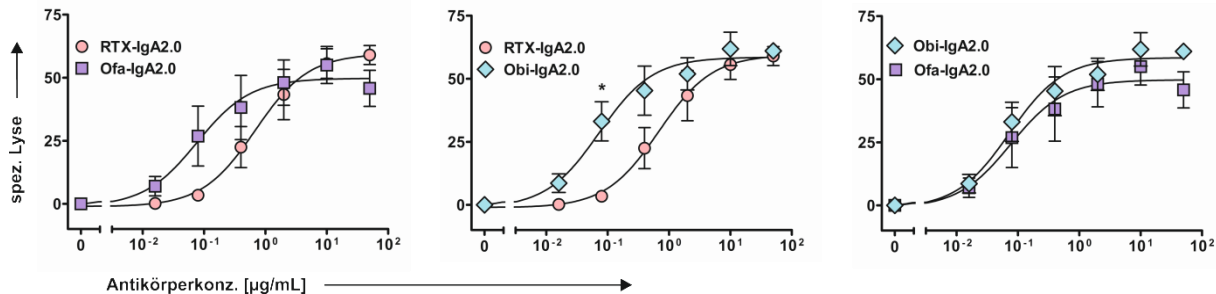


**Abbildung 43: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig PMN (GM-CSF stimuliert) vermittelte ADCC gegen SU-DHL4 Zielzellen zu induzieren.** Zielzellen: SU-DHL4. ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMN gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

signifikant höhere ADCC Aktivität im Vergleich zum RTX-IgA2.0 zeigte, war der Obi-IgA2.0 sowohl dem RTX-IgA2.0 als auch dem Ofa-IgA2.0 bei 2 und  $0,4 \mu\text{g/mL}$  statistisch signifikant überlegen. Bei diesen Versuchsbedingungen entfaltete der Obi-IgA2.0 die höchste Aktivität gegen die Tumorzelllinie Daudi im Vergleich zu seinem jeweiligen IgG1 Pendant und im Vergleich zu den anderen CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörpern.  $\text{EC}_{50}$ -Werte bestätigen die Effektivität von Obi-IgA2.0 ( $0,35 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$ ) gegenüber Ofa- ( $1,09 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ ) und RTX-IgA2.0 ( $3,29 \pm 1,21 \mu\text{g/mL}$ ). Auch die Ergebnisse der ADCC Versuche für die SU-DHL4 Zelllinie zeigten eine statistisch signifikant höhere Lyse der Zielzellen, induziert durch CD20 gerichtete IgA2.0 Antikörper, im Vergleich zu ihrem



jeweiligen parentalen IgG1 Gegenstück (Abbildung 43). Bei Versuchen unter gleichen Bedingungen mit der Zielzelllinie Daudi zeigten sowohl RTX (maximale Lyse in %:  $25,71 \pm 6,732$ ) und Ofa (maximale Lyse in %:  $24,23 \pm 6,314$ ) als auch Obi (maximale Lyse in %:  $41,52 \pm 11,34$ ) im IgG1 Format Lyseaktivität. Die durch RTX-IgA2.0 induzierte spezifische Lyse war in den Konzentrationen 50 und  $10 \mu\text{g/mL}$

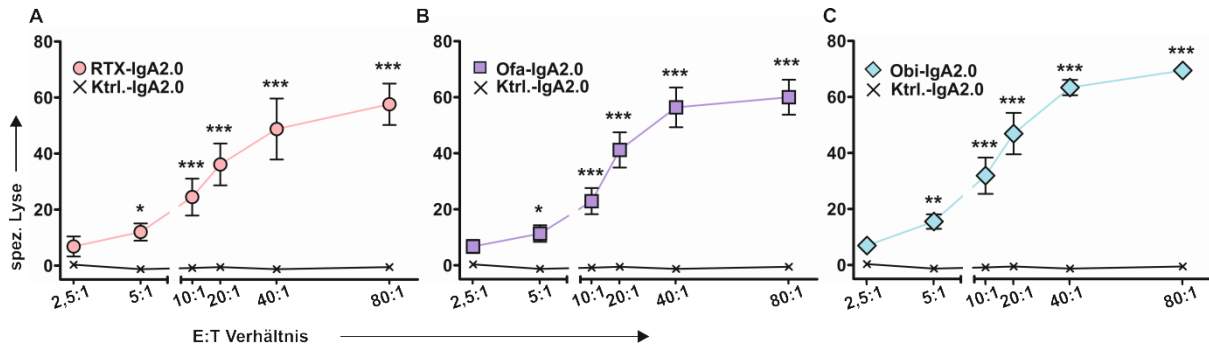


**Abbildung 44: Vergleich der durch drei CD20-gerichtete IgA2.0 Antikörper induzierte ADCC gegenüber SU-DHL4 Zellen.** Zielzellen: SU-DHL4. ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMN gesunder Spender in  $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungsvorsuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

statistisch signifikant unterschiedlich zu der des RTX-IgG1 Pendants ( $p < 0,05 = *$ ). Anders als die induzierten Lyseraten von Ofa-IgA2.0 und Ofa, die sich statistisch in nur einem Wert unterschieden (bei  $10 \mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0,05 = *$ ), zeigte der Obi-IgA2.0 statistisch signifikant erhöhte lytische Aktivität im Vergleich zur IgG1-Kontrolle (hier Obi). In den Konzentrationen 10, 2 und  $0,4 \mu\text{g/mL}$  waren die Messwerte von Obi-IgA2.0 und Obi statistisch signifikant unterschiedlich (in dieser Reihenfolge;  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,001 = ***$ ,  $p < 0,01 = **$ ). In Abbildung 44 ist der Vergleich der drei spezifischen IgA2.0 Antikörper gezeigt. Dabei zeigte sich, dass sich weder RTX-IgA2.0 von Ofa-IgA2.0 noch Obi-IgA2.0 von Ofa-IgA2.0 statistisch signifikant voneinander unterschieden. Nur der Vergleich von Obi-IgA2.0 und RTX-IgA2.0 zeigte bei einer Antikörperkonzentration von  $0,08 \mu\text{g/mL}$  einen statistisch signifikante Verbesserung der lytischen Aktivität für Obi-IgA2.0 ( $p < 0,05 = *$ ).

Ob eine Titration des Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis eventuelle Unterschiede zwischen den drei CD20-gerichteten Antikörpern belegt, sollte im Folgenden untersucht werden. Dazu wurden in den etablierten  $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungsvorsuchen konstante Antikörperkonzentrationen (hier  $10 \mu\text{g/mL}$ ), aber unterschiedliche Verhältnisse von Effektorzellen (hier GM-CSF stimulierte PMN) zu Zielzellen (hier Tumorzelllinie SU-DHL4) eingesetzt. In Abbildung 45 ist die spezifische Lyse der verschiedenen CD20-IgA2.0 Antikörper jeweils gegen einen Kontroll-IgA2.0 mit unspezifische variabler Domäne gezeigt. Sowohl RTX-IgA.0 (Abbildung 45A) als auch Ofa-IgA2.0 (Abbildung 45B) induzierten in diesem Versuchsablauf bereits ab einem E:T Verhältnis von 2,5:1 statistisch signifikant Lyse der SU-DHL4 Zielzellen. Die durch die beiden Antikörper induzierten Lyseraten und deren dazugehörigen Kurven steigern sich bis zu einem E:T Verhältnis von 40:1 und flachen danach ab (Abbildung 45A und B). Der Kurvenverlauf der durch den Obi-IgA2.0 Antikörper induzierten Tumorzellysen ähnelt in diesem Versuchsablauf denen der beiden anderen CD20 gerichteten IgA Antikörper, jedoch induzierte Obi-

IgA2.0 bei einem E:T Verhältnis von 2,5:1 eine statistisch signifikante höhere Tumorzelllyse gegen den irrelevanten Kontrollantikörper (Abbildung 45C, p-Wert<0,01 = \*\*). Im Vergleich der drei verschiedenen CD20-IgA2.0 Antikörper zeigte sich, dass sich RTX-IgA2.0 und Obi-IgA2.0 bei einem E:T Verhältnis von 40:1 statistisch signifikant voneinander unterschieden. Dabei induzierte Obi-IgA2.0 im



**Abbildung 45: Vergleich des ADCC dreier CD20-gerichteter IgA2.0 Antikörper zusammen mit einem Ktrl.-IgA2.0 Molekül in Abhängigkeit des E:T Verhältnisses.** PMN gesunder Spender wurden mit GM-CSF stimuliert. Die Antikörper wurden in einer konstanten Konzentration von 10µg/mL eingesetzt. Zielzellen: SU-DHL4. Statistik: 2-Way-ANOVA; p<0,05 = \*, p<0,01 = \*\*, p<0,001=\*\*\*, Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

Vergleich zum RTX-IgA2.0 Molekül eine statistisch signifikant höhere, spezifische Lyse der SU-DHL4 Zellen induzierte (p-Wert<0,5). Sowohl RTX-IgA2.0 vs Ofa-IgA2.0 als auch Obi-IgA2.0 vs. Ofa-IgA2.0 unterschieden sich in der von ihnen induzierten Tumorzelllyse statistisch nicht signifikant voneinander.

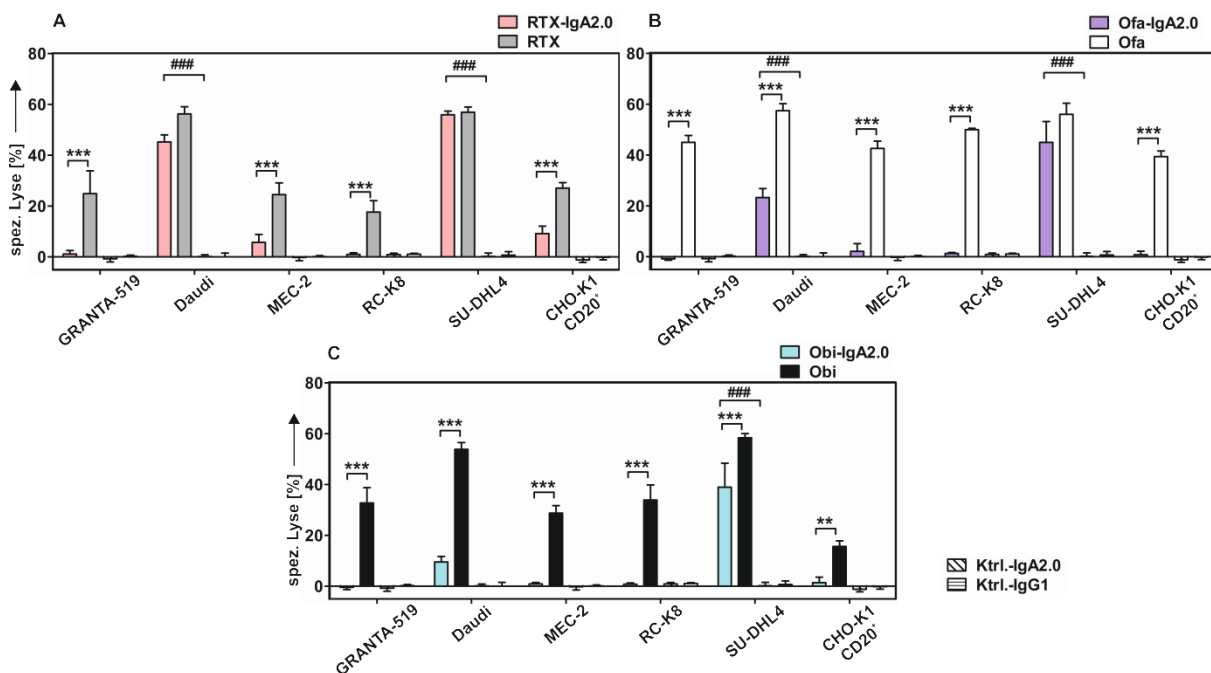
### 3.2.7 Komplementvermittelte Zytotoxizität

#### 3.2.7.1 CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper vermittelte CDC gegen Tumorzelllinien

Dass IgA Antikörper auch das Komplementsystem zur spezifischen Lyse von Tumorzellen aktivieren kann, wurde schon mehrfach gezeigt. IgA Antikörper können jedoch, anders als IgG1 Antikörper, mit ihrem Fc-Teil kein C1q fixieren. C1q wiederum ist als Schlüsselmolekül für die klassische Komplementaktivierung von essentieller Bedeutung. Ergebnisse aus einer vorherigen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe deuten auf eine alternative Komplementaktivierung durch ein CD20-IgA2wt Molekül hin (Lohse *et al*, 2017). Jedoch können sowohl MBL- als auch Bypass-CDC für IgA induzierte CDC eine Rolle spielen. Um das Potential der drei verschiedenen CD20-gerichteten IgA Antikörper zu untersuchen, wurden <sup>51</sup>Chromfreisetzungsversuch durchgeführt, indem die Antikörper mit einer konstanten Konzentration (hier: 50 µg/mL) zusammen mit humanem Serum (25 % v/v) gesunder Spender als Komplementquelle in CDC-Versuchen gegen verschiedene CD20<sup>pos</sup> Zelllinien (Tabelle 6) eingesetzt wurden. In den sechs untersuchten Zelllinien konnten nur die Linien SU-DHL4 und Daudi durch die CD20-IgA2.0 Antikörper lysiert werden (Abbildung 46). Dabei stellte die SU-DHL4 Linie mit Lyseraten mit bis über 50% die am besten zu lysierende Zelllinie für die CD20-IgA2.0 Antikörper dar (spez. Lyse<sub>max</sub>: RTX-IgA2.0=55,9±1,5%; Ofa-IgA2.0=45±8,2%; Obi-IgA2.0=38,9±9,4%).



Die in Daudi Zellen induzierte CDC unterschied sich in sättigenden Konzentrationen deutlich zwischen den verschiedenen CD20-IgA2.0 Antikörpern. Während RTX-IgA2.0 auch hier  $45,2 \pm 2,8\%$  spezifische Lyse induzierte, zeigte Ofa-IgA2.0 eine geringere Lyserate von  $23,24 \pm 3,6\%$ . Obi-IgA2.0 war bei allen

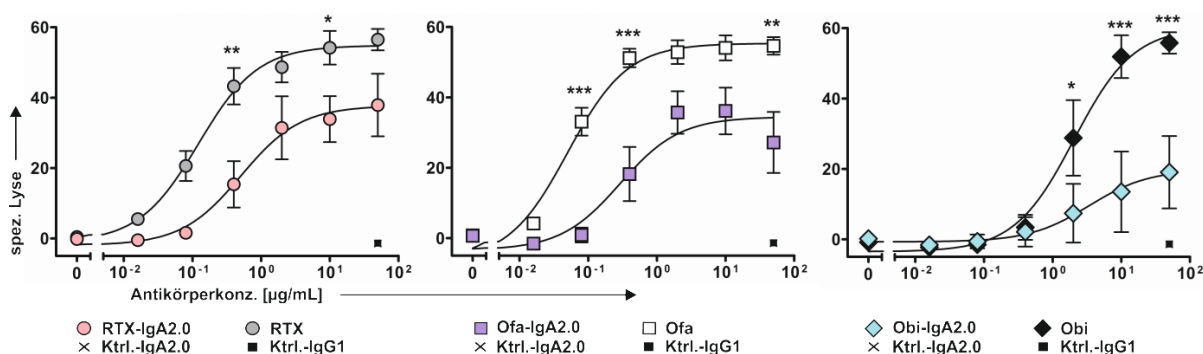


**Abbildung 46: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig CDC gegen verschiedene Zielzelllinien zu vermitteln.** CDC-Versuche wurden mit Serum gesunder Spender in  $^{51}\text{Cr}$ Chromfreisetzungsversuchen durchgeführt. Serumkonzentration = 25 % v/v. Konzentration der spez. - und Kontrollantikörper = 50  $\mu\text{g/mL}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ . Statistisch signifikante Unterschiede zwischen CD20 gerichteten-IgA2.0 und einem Ktrl.-IgA2.0 Antikörper sind mit  $### = p < 0,001$  angegeben. Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

CDC-Versuchen mit verschiedenen Zelllinien der ineffektivste der drei CD20-IgA2.0 Antikörper. Der Kontrollantikörper induzierte keine Lyse dieser Zelllinien. Zur Überprüfung des Versuchssystems wurden neben den spezifischen anti-CD20-IgA2.0 Molekülen auch deren parentale IgG1 Antikörper untersucht (Abbildung 46). In den hier eingesetzten Konzentrationen (50  $\mu\text{g/mL}$ ) induzierten alle IgG1 Antikörper komplementvermittelte Zelllyse der sechs verschiedenen Zelllinien. Dabei war Ofa der effektivste Antikörper in diesem Versuchsablauf. Sogar die für RTX und Obi schwierig zu lysierende Zelllinie RC-K8 (RTX =  $17,6 \pm 4,5\%$  Lyse<sub>max</sub> und Obi =  $33,9 \pm 5,9\%$  Lyse<sub>max</sub>) konnte Ofa bis zu maximal  $49,9 \pm 0,6\%$  der Tumorzellen komplementvermittelt lysieren. Der IgG1 Kontrollantikörper induzierte auch hier keine CDC gegenüber den verschiedenen Tumorzelllinien. Im direkten Vergleich der anti-CD20-IgA2.0 und anti-CD20-IgG1 Moleküle untereinander, paarweise sortiert nach variabler Region, wurde deutlich, dass die durch jeweiligen IgG1 Antikörper induzierte maximale Lyse der Zielzellen stets höher war als die ihrer IgA2.0 Pendants.

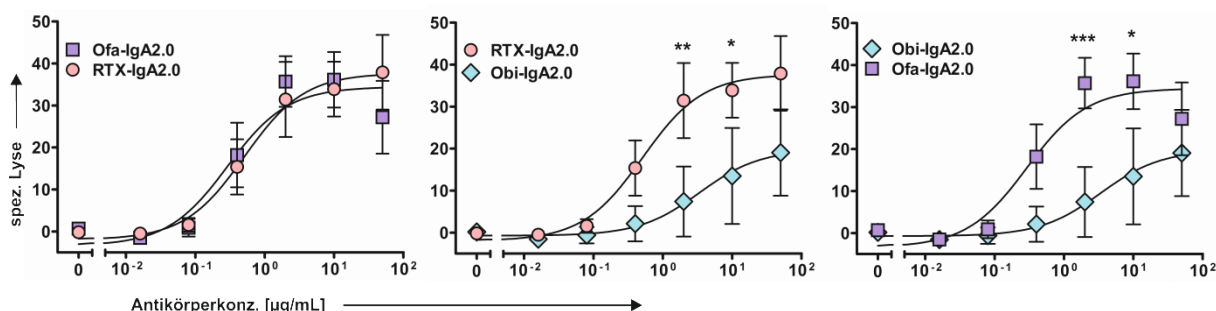
### 3.2.7.2 CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper vermittelte konzentrationsabhängige CDC

Um die Abhängigkeit der CDC von der Antikörperkonzentration zu untersuchen, wurden die Zelllinien



**Abbildung 47: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig CDC gegen SU-DHL4 Zielzellen zu vermitteln.** CDC-Versuche wurden mit Serum gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen durchgeführt. Serumkonzentration 25% v/v. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

SU-DHL4 und Daudi anschließend in weiteren  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen analysiert. Eine konzentrationsabhängige CDC wurde für alle untersuchten CD20-gerichteten Antikörper sowohl für



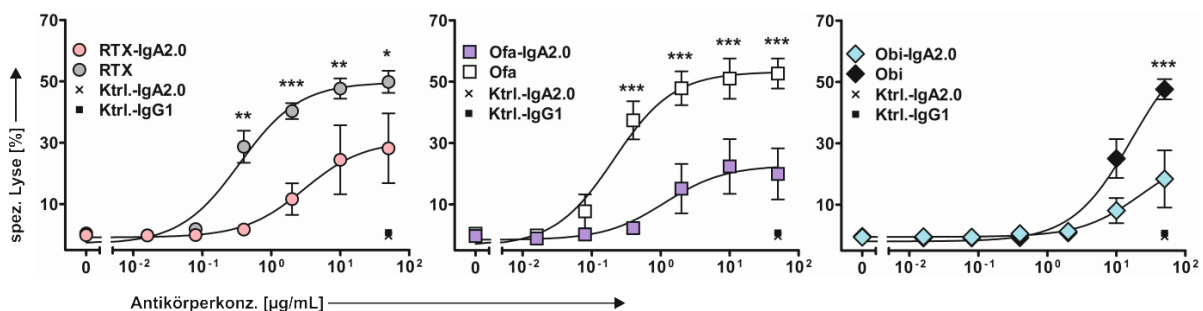
**Abbildung 48: Vergleich dreier CD20-gerichteter IgA2.0 Antikörper und deren Fähigkeit, konzentrationsabhängig CDC gegen SU-DHL4 Zielzellen zu vermitteln.** CDC-Versuche wurden mit Serum gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen durchgeführt. Serumkonzentration=25% v/v. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den spez.-IgA2.0 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

SU-DHL4 (Abbildung 47) als auch Daudi (Abbildung 49) Zielzellen festgestellt. In Versuchen, bei denen SU-DHL4 als Zielzellen dienten, unterschieden sich  $EC_{50}$  und die maximalen Lyseraten (Tabelle 16) der

**Tabelle 16:  $EC_{50}$ -Werte und die Werte der maximalen spezifischen Lyse verschiedener CD20-gerichteter Antikörper aus CDC Versuchen mit SU-DHL4 Zielzellen und 25%v/v humanem Serum gesunder Spender als Komplementquelle.**

Antikörper	$EC_{50} \pm SEM$ [ $\mu g/mL$ ]	Spez. Lyse <sub>max</sub> [%]
RTX-IgA2.0	$0,51 \pm 1,89$	$37,71 \pm 4,1$
RTX	$0,12 \pm 1,36$	$54,83 \pm 2,2$
Ofa-IgA2.0	$0,29 \pm 2,02$	$34,45 \pm 4,0$
Ofa	$0,05 \pm 1,29$	$55,35 \pm 1,7$
Obi	$3,37 \pm 4,78$	$19,75 \pm 7,3$
Obi-IgA2.0	$2,05 \pm 1,44$	$60,28 \pm 4,8$

CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper voneinander. Alle eingesetzten CD20-gerichteten IgG1 Antikörper zeigten eine signifikant höhere Effektivität als ihre jeweiligen anti-CD20-IgA2.0 Pendanten. Die jeweiligen Kontrollantikörper zeigten hier keinerlei CDC Aktivität. In Abbildung 48 ist der Vergleich zwischen den drei spezifischen CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörpern untereinander dargestellt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen RTX-IgA2.0 und Ofa-IgA2.0 (Abbildung 48, links). Weiterhin wurde beobachtet, dass sowohl RTX-IgA2.0 als auch Ofa-IgA2.0 komplementabhängig signifikant höhere Lyse der SU-DHL4 Zellen vermittelten als das Obi-IgA2.0 Molekül. Auch in Daudi Zellen konnte die Abhängigkeit der induzierten CDC von der Antikörperkonzentration nachgewiesen werden. Im Vergleich der jeweiligen anti-CD20-IgA2.0/IgG1 Paare (RTX-IgA2.0 vs. RTX-IgG1 etc.) konnten alle IgG1 Antikörper konzentrationsabhängig signifikante Lyse der Zielzellen induzieren, wobei Ofa am effektivsten (Abbildung 49, Mitte) und Obi am uneffektivsten (Abbildung 49, rechts) CDC vermittelte. Die durch anti-CD20-IgA2.0 induzierte,



**Abbildung 49: CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper und deren Fähigkeit konzentrationsabhängig CDC gegen Daudi Zielzellen zu vermitteln.** CDC-Versuche wurden mit Serum gesunder Spender in  $^{51}$ Chromfreisetzungsvorsuchen durchgeführt. Serumkonzentration 25% v/v. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen spez.-IgA2.0 und spez.-IgG1 Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

komplementvermittelte Lyse war gegen die Kontrollantikörper nicht statistisch signifikant. Auch untereinander unterschied sich die von den drei CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörpern induzierte Lyse

**Tabelle 17: EC<sub>50</sub>-Werte verschiedener CD20-gerichteter Antikörper aus CDC Versuchen mit Daudi Zielzellen und 25%v/v humanem Serum gesunder Spender als Komplementquelle.**

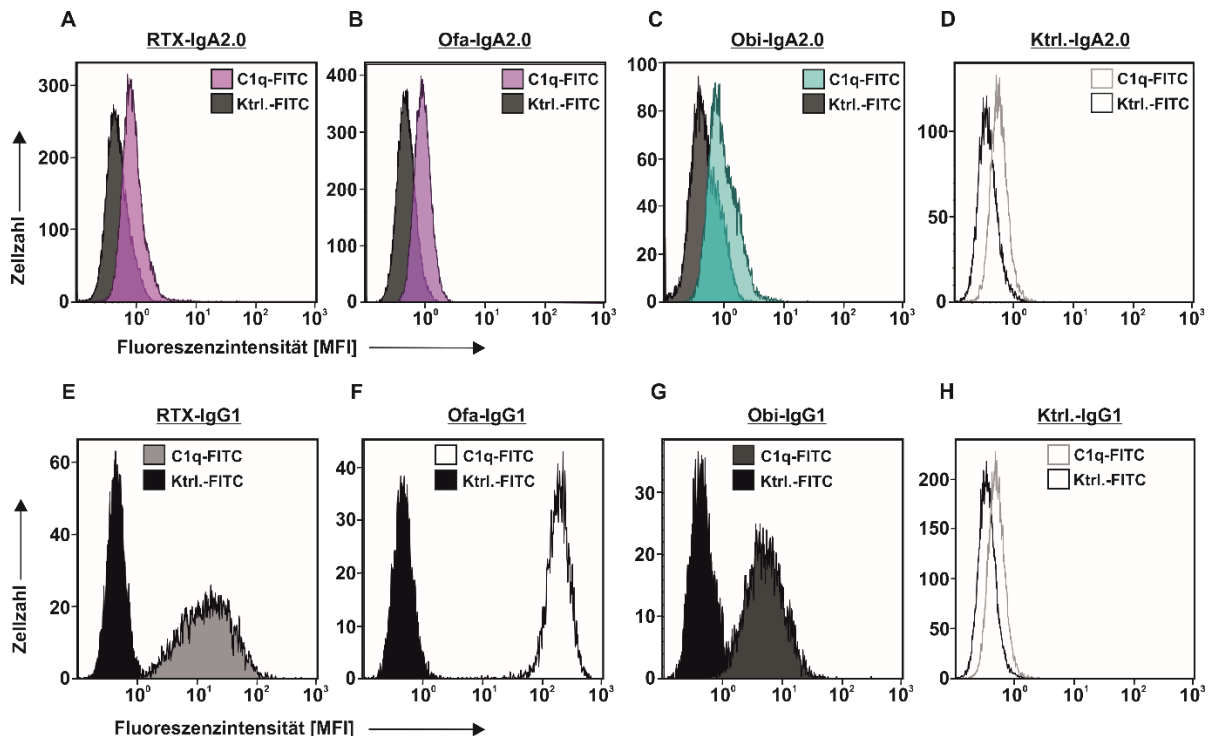
Antikörper	EC <sub>50</sub> ± SEM [µg/mL]
RTX-IgA2.0	2,99 ± 2,53
RTX	0,35 ± 1,31
Ofa-IgA2.0	1,14 ± 2,72
Ofa	0,21 ± 1,48
Obi-IgA2.0	22,55 ± 3,36
Obi	16,85 ± 1,39

der Zielzellen nicht statistisch signifikant. Während RTX und Ofa im IgG1-Format mittlere effektive Konzentrationswerte (EC<sub>50</sub>) von 0,35 ± 1,31 µg/mL für RTX und 0,21 ± 1,48 für Ofa erreichten waren die Werte der IgA2.0 Pendanten dazu etwas höher (siehe Tabelle 17). Während das Antikörperpaar

Ofa-IgA2.0/IgG in diesen Versuchen sehr effektiv CDC in Tumorzelllinien induzieren konnte zeigte das Antikörperpaar Obi-IgA2.0/IgG1 nur geringe CDC Aktivität.

### 3.2.7.3 CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper vermittelte C1q-Bindung und C4b-Deposition auf SU-DHL4 Zellen

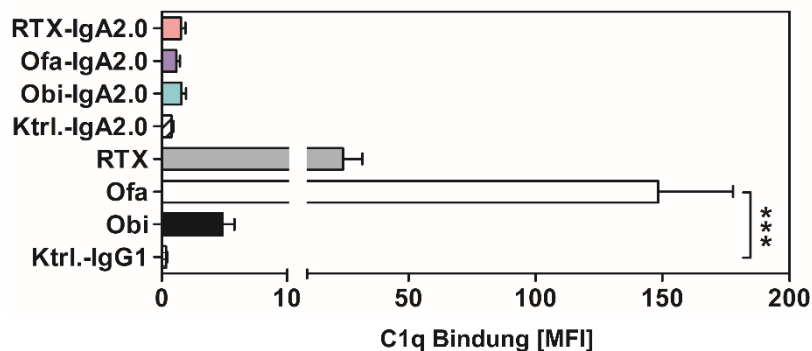
IgA Antikörper können mit ihrem Fc-Teil, anders als IgG1 Antikörper, kein C1q binden. Während IgG1-



**Abbildung 50: CD20-gerichtete Antikörper vermittelten eine Anlagerung von C1q auf SU-DHL4 Zielzellen.** In Anwesenheit von humanem Serum (5 % v/v) gesunder Spender, wurde die Fähigkeit der verschiedenen CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper C1q zu binden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Konzentration der eingesetzten spez. und Ktrl.-Antikörper = 10 µg/mL. Dargestellt sind die Histogramme aus Zellzahl und Fluoreszenzintensität. Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind exemplarisch gezeigt. Sekundärantikörper = Polyclonal Rabbit Anti-Human C1q Complement/FITC

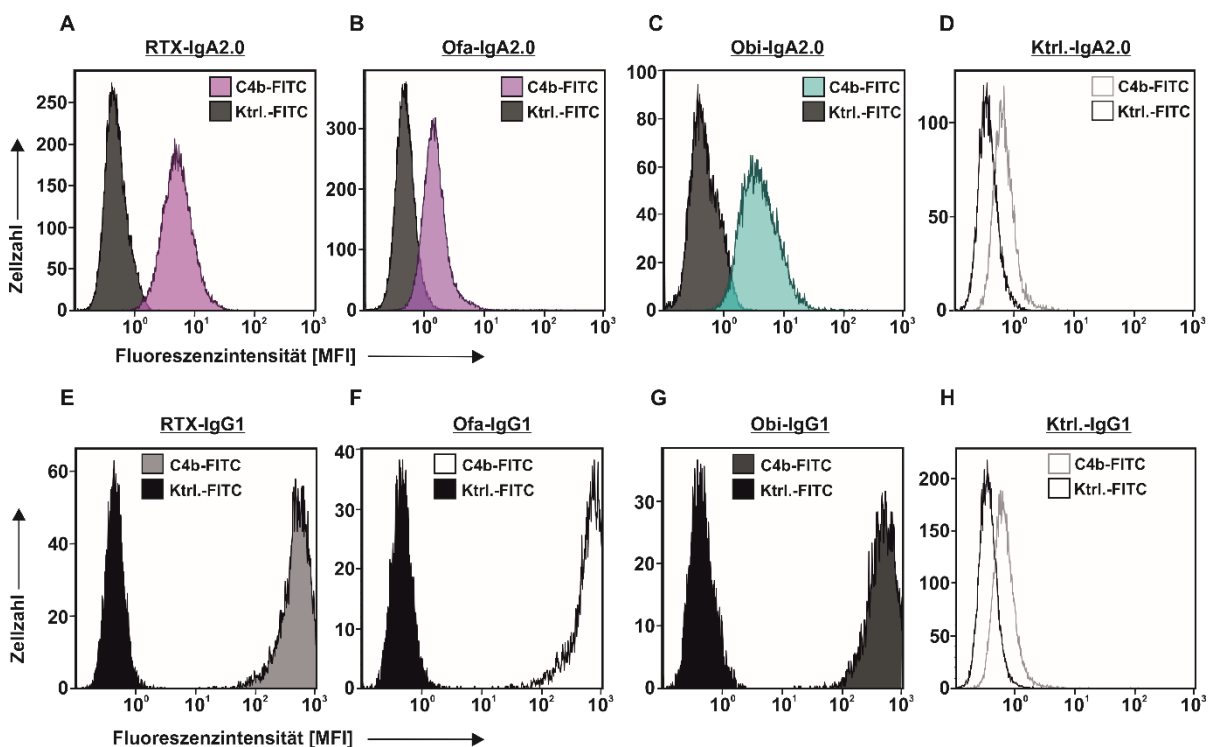
Antikörper über die Bindung von C1q effizient den klassischen Weg der Komplementkaskade aktivieren können, ist für IgA Antikörper im CD20-Hintergrund zwar CDC-Aktivität gegen Zielzellen beschrieben, diese wird jedoch vermutlich über den alternativen Komplementweg oder über den sog. CDC-bypass vermittelt. In Abbildung 50 sind die Histogramme der C1q-Färbung auf SU-DHL4 Zellen gezeigt, die entweder mit spezifischen, CD20-gerichteten Antikörpern oder aber mit jeweiligen Isotypkontrollantikörpern inkubiert wurden und anschließend auf ihre Reaktivität mit C1q im Serum analysiert wurden. Während die drei IgA2.0 Antikörper (RTX, Ofa und Obi) keinerlei C1q-Bindung vermitteln (Abbildung 50A bis C), war eine C1q-Bindung auf den Zielzellen nach der Vorinkubation mit CD20 IgG1-Antikörpern nachweisbar (Abbildung 50E bis G). Jeweilige Kontrollantikörper vermittelten keine C1q-Bindung (Abbildung 50D und H). Obwohl die Histogramme eine C1q-Anlagerung aller drei IgG1-Antikörper nahelegten, zeigt die statistische Auswertung, dass tatsächlich nur Ofatumumab im Vergleich zu einem Ktrl. IgG1 Antikörper eine signifikante ( $p < 0,001$ ) C1q-

Bindung vermittelt. Weiterhin ist in Abbildung 52 eine durchflusszytometrische Bestimmung der C4b-Deposition auf SU-DHL4 Zellen gezeigt. Anders als bei der C1q-Bindung wurden in diesem



**Abbildung 51: CD20-gerichtete Antikörper vermittelten eine Anlagerung von C1q auf SU-DHL4 Zielzellen.** In Anwesenheit von humanem Serum (5 % v/v) gesunder Spender, wurde die Fähigkeit der verschiedenen CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper C1q zu binden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Konzentration der eingesetzten spez. und Ktrl.-Antikörper = 10 µg/mL. Dargestellt sind Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen CD20-Antikörpern und jeweiligen Ktrl.-Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Jeweilige Kontrollantikörper zeigten keine spezifische C1q Bindung. Sekundärantikörper = Polyclonal Rabbit Anti-Human C1q Complement/FITC. One-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

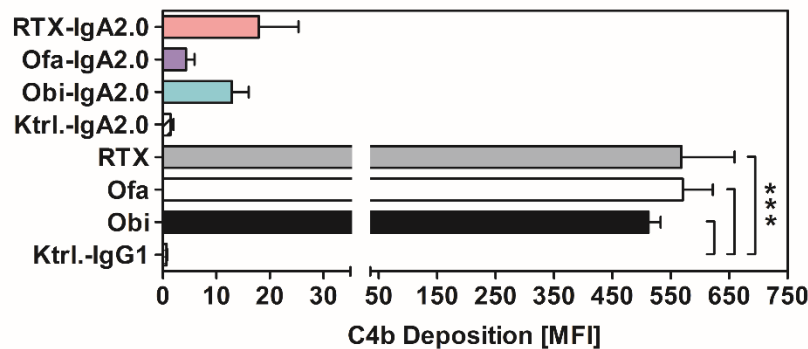
Versuchsablauf auch spezifische Bindungswerte für die drei CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörper (Abbildung 52A bis C) erhalten. Dennoch war anhand der Histogramme bereits erkennbar, dass alle



**Abbildung 52: CD20-gerichtete Antikörper vermittelten eine Anlagerung von C4b auf SU-DHL4 Zielzellen.** In Anwesenheit von humanem Serum (5 % v/v) gesunder Spender, wurde die Fähigkeit der verschiedenen CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper C4b zu binden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Konzentration der eingesetzten spez. und Ktrl.-Antikörper = 10 µg/mL. Dargestellt sind die Histogramme aus Zellzahl und Fluoreszenzintensität. Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind exemplarisch gezeigt. Sekundärantikörper = Polyclonal Rabbit Anti-Human C4b Complement/FITC. One-way ANOVA mit Bonferroni post-test.

drei spezifischen CD20-IgG1 Antikörper eine deutlich höhere C4b-Deposition vermittelten als die

IgA-Vergleichsmoleküle (Abbildung 52E bis G). Alle eingesetzten Kontrollantikörper zeigten keine Anlagerung von C4b (Abbildung 52D und H). Die statistische Auswertung der C4b-Anlagerungsexperimente zeigte, dass die von den IgA2.0-Antikörpern vermittelte C4b-Deposition im Vergleich zu einem Kontrollantikörper nicht statistisch signifikant war. Während RTX-, Ofa- und Obi-IgA2.0 nur geringe Mengen C4b an die Zielzellen anlagern konnte, waren die drei spezifischen CD20-IgG1 Antikörper gleich effizient. Sie vermittelten eine statistisch signifikante Anlagerung von C4b im Vergleich zu einer unspezifischen Isotypkontrolle und unterschieden sich untereinander nicht



**Abbildung 53: CD20-gerichtete Antikörper vermittelten eine Anlagerung von C4b auf SU-DHL4 Zielzellen.** In Anwesenheit von humanem Serum (5 % v/v) gesunder Spender, wurde die Fähigkeit der verschiedenen CD20-IgA2.0 und -IgG1 Antikörper C4b zu binden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Konzentration der eingesetzten spez. und Ktrl.-Antikörper = 10 µg/mL. Dargestellt sind Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen CD20-Antikörpern und jeweiligen Ktrl.-Antikörpern sind wie folgt angegeben:  $p < 0,001 = ***$ . Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Jeweilige Kontrollantikörper zeigten keine spezifische C4b Bindung. Sekundärantikörper = Polyclonal Rabbit Anti-Human C4b Complement/FITC.

Abbildung 53. Keiner der eingesetzten Kontrollantikörper zeigte eine komplementvermittelte Anlagerung von C4b (Abbildung 52D und H sowie Abbildung 53).

### 3.3 tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

**Tabelle 18: Zusammenfassung aller in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse.** Starke Aktivierung = +++, mittlere Aktivierung = ++, schwache Aktivierung = +, Aktivierung möglich = +/-, keine Aktivierung = -, keine Ergebnisse erhoben = /.

	RTX-IgA2.0	RTX-IgG1	Ofa-IgA2.0	Ofa-IgG1	Obi-IgA2.0	Obi-IgG1
CD20 Bindung	++	++	+++	+++	+++	+++
HA und PCD	++	++	+	+	+++	+++
B-Zelldepletion	++	++	/	/	+++	+++
ADCC PMN	++	+/-	++	+/-	+++	+/-
ADCC MNC	-	++	-	+++	-	+++
CDC	+	+++	+	+++	-	+

## 4. Diskussion

### 4.1 Produktion und Aufreinigung CD20 gerichteter IgA Antikörper

Die Produktion monoklonaler IgA Antikörper in stabil transfizierten CHO-Zelllinien war zum Zeitpunkt des Projektbeginns bereits im Labor etabliert. Während stabile Zelllinien zur Produktion anderer therapeutischer IgA Antikörper bereits erfolgreich mit Hilfe des GS Gene Expression System™ von Lonza (Lonza Group AG, Basel, CH) etabliert wurden (Lohse *et al*, 2016), war besonders die Selektionierung antikörperproduzierender Zellklone in diesem Projekt eine Herausforderung. Das Protokoll der Lipofektion der CHO-K1 Zellen war etabliert und der DNA-Transfer in die Zellen gelang ohne Probleme. In der ersten Zeit nach der Transfektion waren humane IgA Antikörper sowohl mittels ELISA als auch durchflusszytometrisch in Zellkulturüberständen nachweisbar. Im Zeitverlauf von ca. drei Monaten verringerten sich die Produktionseffizienz im Zellkulturüberstand von ursprünglich 3mg/L (Zellkulturüberstand) auf ca. 40 µg/L (Zellkulturüberstand). Die stringente Selektion der transfizierten Zellen ist der wichtigste Schritt bei der Etablierung von stabilen, antikörperproduzierenden Zellklonen (die hohe Antikörpertiter erreichen). Besonders die langen Zeitspannen, die zur Etablierung stabiler, antikörperproduzierender Zellklone benötigt werden, führten in den letzten fünf Jahren zu einer Verlagerung hin zu einer vermehrten Verwendung transienter Expressionssysteme, um therapeutische IgA Antikörper herzustellen (Rouwental *et al*, 2016; Hart *et al*, 2017). Diese Entwicklung erlaubt die Expression vieler verschiedener Antikörpersequenzen in kürzester Zeit. Da sich stabile – und transiente Produktionssysteme in ihren Eigenschaften wie bspw. der Vermittlung von posttranslationalen Modifikationen der produzierten Antikörper oder der erreichten Produktionseffizienz während des Produktionszyklus unterscheiden, rückt das intelligente Design von Expressionsvektoren in den Fokus, um das jeweils verwendete System so effizient wie möglich nutzen zu können (Mason *et al*, 2012).

N-Glykosylierungsstellen monoklonaler Antikörper, von sowohl IgG1 als auch IgA Antikörpern, stehen im engen Zusammenhang mit funktionellen Eigenschaften der Moleküle. Die Glykooptimierung (das Entfernen des *core*-Fucoserestes) von IgG1 Antikörpern bspw. erhöhte deren Affinität zu dem aktivierenden FcγRIIIA auf NK-Zellen, Makrophagen sowie Subpopulationen von Monozyten und T Zellen (Nimmerjahn & Ravetch, 2005). In Bezug auf IgA Antikörper, die natürlicherweise eine stark exponierte N-Glykosylierung (und O-Glykosylierung bei IgA1) wurde gezeigt, dass selbst das enzymatische Entfernen aller N-Glykosylierungsstellen im CH2-Fc die Bindungsaffinität der Antikörper an FcαRI nicht veränderte (Gomes *et al*, 2008). Abgesehen von der Interaktion zwischen FcR und Fc-Domäne, ist die Glykosylierung von IgA Antikörpern hauptsächlich an deren kurzen Serumretentionszeiten beteiligt. Zwar binden IgA Antikörper, anders als Antikörper vom IgG1 Isotyp, nicht an den FcRn, dennoch kann deren drastisch verringerte Serumretentionszeit dadurch nur teilweise erklärt werden. Besonders die Bindung exponierter Glykostrukturen



monomerer und polymerer IgA Antikörper an den ASGPR beeinflusst deren Serumretentionszeiten drastisch (Stockert *et al*, 1982). In Mäusen konnte die Reduktion von N-Glykosylierungsstellen eines therapeutischen Antikörperformates sowie die Erhöhung des Grades an terminaler Sialylierung dessen Serumretentionszeiten in Mäusen verlängern (Lohse *et al*, 2016). Besonders das vollständige Sialylieren von N-Glykosylierungsstellen sollte bei der Produktion von IgA Antikörpern im Vordergrund stehen, um die Bindung an den ASGPR weitestgehend zu vermeiden. Daten zu optimierten IgA-Molekülen einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe lassen darauf schließen, dass die in CHO-K1 Zellen produzierten Antikörper durch einen hohen Grad endständiger Sialylsäuren eine verbesserte Pharmakokinetik aufweisen als vergleichbare nicht optimierte IgA Antikörper (Lohse *et al*, 2016). Inwiefern sich in CHO K1 Zellen produzierte IgA Antikörper von den Antikörperchargen unterscheiden, die transient in HEK-Zellen produziert wurden, werden massenspektrometrische Untersuchungen zur Glykosylierungsstruktur und *in vivo* Experimente zur Pharmakokinetik zeigen.

Die Reinigung von IgA Antikörperformaten aus antikörperhaltigen Zellkulturüberständen mittels Affinitätschromatographie ist von mehreren Gruppen etabliert (Lohse *et al*, 2016; Meyer *et al*, 2016; Hart *et al*, 2017). Bisher wurden aufgrund ihrer Verfügbarkeit ausschließlich humane-kappa-Ketten-spezifische Affinitätsbeads (CaptureSelect™ LC-kappa-hu) zur Aufreinigung IgA-haltiger Zellkulturüberstände verwendet. In dieser Arbeit wurden erstmals auch IgA-CH1 spezifische Affinitätsbeads (CaptureSelect™ IgA-CH1 (Hu) Affinity Matrix) verwendet und mit dem üblichen Aufreinigungsprotokoll verglichen. Methodisch unterschied sich die Verwendung der beiden Matrices nicht, da Vorgehensweise und Puffer identisch waren. Aufgrund des von den Zellen produzierten Leichtkettenüberschusses war die Verwendung von IgA-CH1 Affinitätsbeads in Bezug auf Zeit und Kosten jedoch etwas effizienter. Da beide verwendeten Matrices eine Bindungskapazität von 10 – 15 mg Antikörper pro eingesetzten mL Matrix besitzen, mussten die Zellkulturüberstände die einen hohen Antikörpertiter und einen dementsprechend hohen Anteil an freien  $\kappa$ -Leichtketten aufwiesen, unter Verwendung der CaptureSelect™ LC-kappa-hu-Matrix in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen aufgereinigt werden. Die freien Leichtketten in den antikörperhaltigen Zellkulturüberständen sättigten humane-kappa-Ketten-spezifische Affinitätsbeads ab und reduzierten die Ausbeuten monomerer Antikörperpräparationen drastisch. Wurden die Zellkulturüberstände über eine IgA-CH1 Matrix aufgereinigt, konnte die wiederholte Präparation derselben Zellkulturüberstände minimiert und zudem auf eine präparative Gelfiltrationschromatographie verzichtet werden.

IgG Antikörper werden in der biotechnologischen Praxis entweder über agarosegekoppeltes Protein A oder Protein G gereinigt. Während alle vier IgG Subklassen äußerst effizient an Protein G binden, können IgG3 Antikörper nicht über Protein A-Säulen gereinigt werden. Beide Proteine haben einen bakteriellen Ursprung, werden mittlerweile auch rekombinant produziert und erkennen spezifisch IgG-Fc-Teile. Ein rekombinant gekoppeltes Protein A/G Molekül erkennt neben IgG Antikörpern auch

solche vom IgA, IgE und IgM Isotyp und wäre daher sicherlich eine Alternative zu den sehr kostenintensiven humane-kappa-Ketten-spezifischen oder IgA-CH1 spezifischen Affinitätsmatrix, die während dieser Arbeit verwendet wurden. Zusätzlich wäre auch der Einsatz einer agarosegekoppelten Protein L Matrix zur Aufreinigung von IgA Antikörpern denkbar. Protein L ist ebenso wie Protein A und G bakteriellen Ursprungs, erkennt aber anders als A/G nicht die konstante Region der Antikörper, sondern einige Subtypen von kappa-Leichtketten (Grodzki & Berenstein, 2010). Seit den 1980er Jahren wird auch Jacalin, ein Lektin des Jackfruchtbaumes, zur Präzipitation von humanem IgA aus bspw. Serumproben verwendet (Roque-Barreira & Campos-Neto, 1985). Mittlerweile ist immobilisiertes Jacalin gekoppelt an eine Agarosematrix kommerziell erhältlich. Besonders die Vermeidung vieler aufeinanderfolgender Reinigungsschritte durch den Einsatz einer spezifischen Affinitätsmatrix sollte im Vordergrund der Aufreinigung von IgA Antikörpern stehen, um die Effizienz des Herstellungsprozesses sowohl zeitlich als auch kostentechnisch zu erhöhen.

#### 4.2 Bindungsverhalten der generierten IgA Antikörper an CD20

Rituximab und Ofatumumab zeigen, anders als Obinutuzumab, eine 2:1 Stöchiometrie der Bindung an CD20 (Niederfellner et al, 2011). Während die Bindung verschiedener CD20-gerichteter Antikörper oder -Antikörperfragmente in früheren Studien auf Tumorzelllinien gezeigt werden konnte (Chan *et al*, 2003; Teeling *et al*, 2004), wurden die Bindungsstudien in dieser Arbeit mit einer CHO K1 Zelllinie durchgeführt, die stabil das humane CD20 exprimiert. Die MFI-Werte der durchflusszytometrischen Bestimmung ergaben geringere  $EC_{50}$ -Werte für Ofa- und Obi-IgA/IgG1 im Vergleich zu den beiden eingesetzten RTX-Varianten. Diese Beobachtung deckt sich mit bereits veröffentlichten Studien zur Avidität von RTX (Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) =  $\sim 4.5$  nM), Ofa und Obi ( $K_D$  =  $\sim 4$  nM) zu dem Antigen CD20 (Zitat für RTX und Obi  $K_D$  : Mössner *et al*, 2010). Der Austausch der konstanten Regionen hatte somit keinen Einfluss auf die Avidität der drei untersuchten Antikörper. Zusätzlich unterschieden sich die MFI Werte unter sättigenden Konzentrationen der CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörper statistisch nicht signifikant voneinander.

Anders als in Bindungsexperimenten anderer Arbeitsgruppen (Mössner *et al*, 2010; Teeling *et al*, 2006) konnte jedoch auch für die drei parentalen IgG1 Antikörper keine 2:1 Stöchiometrie der Antigenbindung beobachtet werden. RTX, Ofa und Obi zeigten verschiedene Bindungsmaxima, wobei Obinutuzumab den geringsten und Ofatumumab den höchsten Wert zeigte. Anhand dieser Untersuchungen war eine eindeutige Zuordnung der Antikörper in eine Typ I- oder Typ II-Kategorie nicht möglich. Auch für die drei spezifischen IgA2.0 Antikörper konnte diese Zuordnung anhand der Versuchsergebnisse nicht erfolgen. Alle IgA2.0-Antikörper zeigten geringere  $MFI_{max}$ -Werte als ihr jeweiliger parentaler IgG1-Antikörper. Als Nachweis der Antikörperbindung an das Antigen CD20 wurde zur Detektion ein Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Humane-Kappa-Kette-FITC) für alle

spezifischen und unspezifischen monoklonalen Antikörper verwendet. Eine unterschiedliche Erkennung der verschiedenen Antikörperformate und -isotypen durch den Sekundärantikörper ist denkbar und kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zu Bindungsstudien verschiedener Typ I- und Typ II-Antikörper bezüglich ihrer Stöchiometrie wurden auch in anderen Arbeitsgruppen durchflusszytometrisch durchgeführt. Die Versuchsabläufe in diesen Studien beinhaltenen aber, anders als in unseren Versuchen, keine indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Sekundärantikörpers, sondern ausschließlich die mit verschiedenen Markern direkt-gekoppelten CD20 gerichtete Antikörper oder Antikörperfragmente (FITC-markiert in: Teeling *et al*, 2006) oder mit radioaktivem Jod<sup>125</sup> markiert (in: Cragg *et al*, 2003; Teeling *et al*, 2004). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus dieser und den vorherigen Studien anderer Arbeitsgruppen ist daraufhin nicht gegeben.

#### **4.3 Funktionelle Charakterisierung rekombinanter, CD20 gerichteter IgA Antikörper**

Die funktionelle Charakterisierung hergestellter, optimierter IgA Antikörperformate sowie deren Vergleich zu ihrem jeweiligen parentalen, in der Klinik zugelassenen IgG1-Pendants war ein Kernpunkt der hier vorgelegten Arbeit. Dabei wurde sowohl deren Fähigkeit untersucht, *in vitro* B-Zellen aus dem Blut gesunder Spender zu depletieren, als auch deren Kapazität, sowohl Fab- als auch Fc-vermittelte Effekte zu vermitteln. Hauptaugenmerk lag bei der Untersuchung von IgA-vermittelter homotypischer Aggregation und Induktion des programmierten Zelltods sowie der Rekrutierung von PMN als Effektorzellen für ADCC und der Aktivierung einer komplementvermittelten Lyse von CD20<sup>pos</sup> Tumorzelllinien.

##### **4.3.1 Die durch verschiedene CD20-gerichtete IgA und -IgG Antikörper induzierte B-Zelldepletion im Vergleich**

CD20-gerichtete Antikörper sind in der Lage, B-Zellen zu depletieren, und werden aufgrund dieser Eigenschaft sowohl bei der Behandlung von Krebserkrankungen, die das B-Zellkompartiment betreffen, als auch bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt, wenn B-Zellen an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt sind (bspw. bei multipler Sklerose, siehe: Wekerle, 2017 oder rheumatoider Arthritis siehe: Marston *et al*, 2010).

Methodisch gab es im Vorfeld Bedenken bzgl. der Verwendung eines fluoreszenzgekoppelten-CD19 Antikörpers. Bei der Inkubation von B-Zellen mit CD20-gerichteten Antikörpern kann das Antigen CD20 in dem Prozess des „shaving“ von den Zielzellen entfernt werden (Beum *et al*, 2011; Pedersen *et al*, 2011). Zielzellen werden dabei nicht lysiert, was zum Überleben einer Population von Zellen führt, die nur noch geringe Mengen des Zielantigens und möglicherweise auch geringere Mengen

anderer Antigene (bspw. CD19) exprimieren. Da der Verlust des CD19-Signals in den Experimenten dieser Arbeit als „B-Zelldepletion“ charakterisiert wurde, könnte der durch „*shaving*“ bedingte Verlust von CD19 die Ergebnisse verfälschen. Für weiterführende Versuche soll zukünftig ein weiterer B-Zellmarker (bspw. CD24) eingesetzt werden, um die Ergebnisse verifizieren zu können und einer Verfälschung durch Antigenverlust vorzubeugen.

Die in dieser Arbeit hergestellten IgA Antikörperformate sollten in einem ersten Schritt in humanem Vollblut gesunder Spender mit ihren jeweiligen parentalen IgG1 Antikörpern verglichen werden, um zu überprüfen, ob und in welchem Maße sie in der Lage sind, B-Zellen zu depletieren. Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte, dass die Antikörperpaare, die sich jeweils die variablen Regionen teilen (RTX-IgA2.0/-IgG1 oder Obi-IgA2.0/-IgG1), vergleichbare Effekte erzielten. Dabei depletierten Antikörper mit variablen Regionen des Typ II-Antikörpers Obinutuzumab B-Zellen signifikant besser als die Antikörper, die variable Regionen von Rituximab trugen. Während IgG1-Antikörper aufgrund ihres Fc-Teils Effektorzellen wie NK-Zellen für ADCC rekrutieren (Wang *et al*, 2015) und zusätzlich die klassische Komplementkaskade für CDC aktivieren können (Cragg *et al*, 2003), rekrutieren IgA Antikörper gänzlich andere Effektorzellpopulationen für ADCC und können über ihren Fc-Teil keine klassische Komplementaktivierung vermitteln. Das Potential anderer Effektorzellen, besonders die neutrophiler Granulozyten, wurde schon in den 1970er Jahren (Gale & Zighelboim, 1975) erkannt und das Forschungsinteresse zur Nutzung dieser Zellpopulation für therapeutische Zwecke besteht bis heute.

Welche Effektormechanismen in diesen B-Zelldepletionsversuchen entscheidend für die Effizienz der verwendeten Antikörperformate beteiligt waren, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht eindeutig festlegen. Eine Stimulation von Granulozyten in Vollblutexperimenten mit GM-CSF zeigte keinerlei Einfluss, weder auf die von den IgA2.0 noch auf die von den IgG1-Antikörpern vermittelte B-Zelldepletion. Die Stimulation von Granulozyten mit GM-CSF kann somit die CD20-IgA2.0/-IgG1 Antikörper-vermittelte B-Zelldepletion nicht weiter verbessern. Da alle Antikörper in den Stimulationsexperimenten mit GM-CSF in sättigenden Konzentrationen eingesetzt wurden, wäre es denkbar, dass sich der Einfluss von GM-CSF auf die Vollblutexperimente besonders unter suboptimalen Bedingungen besser herausarbeiten ließe. Die konzentrationsabhängige Aktivität der drei verschiedenen CD20-gerichteten Antikörper in An- bzw. Abwesenheit von GM-CSF könnte Unterschiede zwischen den einzelnen Molekülen deutlicher zeigen.

Zwar zeigte die Blockade der komplementvermittelten Zytotoxizität durch Einsatz des Antikörpers Eculizumab eine verminderte Anzahl depletierter B-Zellen, wenn Rituximab eingesetzt wurde, doch diese Verminderung war statistisch nicht signifikant (siehe Anhang, Abbildung 55). Dieses Ergebnis stimmt mit der Tatsache überein, dass aufgrund einer fehlenden Bindestelle für C1q im Fc-Teil von IgA Antikörpern eine klassische, IgA-vermittelte CDC nicht zu erwarten war. Andere Studien zeigten,

dass CD20-gerichtete IgA Antikörper *in vitro* komplementabhängige, zytolytische Aktivität gegen sowohl Tumorzelllinien als auch primäre Tumorzellen vermittelten, obwohl eine C1q Bindestelle im IgA-Fc fehlte (Lohse *et al.*, 2017; Pascal *et al.*, 2012). Der Typ II-Antikörper Obi-IgG1 ist von Natur aus nur sehr begrenzt in der Lage, CDC zu induzieren (Tobinai *et al.*, 2017). Die von Obi induzierte B-Zelldepletion war komplementunabhängig und lässt vermuten, dass andere Fab- oder Fc-vermittelte Effekte die Wirksamkeit dieses Antikörpers und der anderen Formate beeinflussen.

#### **4.3.2 Homotypische Aggregation und caspaseunabhängiger Zelltod vermittelt durch CD20-gerichtete IgA und -IgG Antikörper im Vergleich**

Die Bindung des CD20-gerichteten Typ II Antikörpers Obinutuzumab an sein Antigen löst eine Reihe verschiedener direkt vermittelter Effekte aus, die mit einer homotypischen Aggregation der Zielzellen beginnend zum programmierten Zelltod führen (Honeychurch *et al.*, 2012). Die Frage, ob ein Typwechsel CD20-gerichteter Antikörper durch den Austausch der konstanten Regionen stattfinden kann, sollte zunächst mithilfe mikroskopischer -und durchflusszytometrischer Untersuchungen erfolgen. Mithilfe mikroskopischer Übersichtsaufnahmen sowie durchflusszytometrischer Untersuchungen zum Grad des durch Antikörper induzierten Zelltodes sollten Typ II Eigenschaften der Antikörper bestätigt werden. Da direkte Effekte wie homotypische Aggregation vom Fc-Teil unabhängig vermittelt werden, erwarteten wir besonders für das Obi-IgA2.0 Molekül aufschlussreiche Ergebnisse. Anders als in Studien anderer Arbeitsgruppen, in denen Antikörperfragmente ohne Fc-Domäne eingesetzt wurden, können IgG1 Antikörper an FcγRIIB binden, der auf Zielzellen wie bspw. Daudi exprimiert wird (Brooks *et al.* 1989). Eine Interaktion von CD20 und FcγRIIB durch die Bindung eines CD20-gerichteten IgG1 Moleküls kann auf Daudi Zielzellen nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass je nach eingesetzter Tumorzelllinie CD20-gerichtete IgA Antikörper in der Lage waren, sowohl homotypische Aggregation als auch spezifischen Zelltod der Zielzellen zu vermitteln. Dabei unterschieden sich die verschiedenen IgA2.0 Antikörper untereinander. Während Obi- und RTX-IgA2.0 signifikant spezifischen Zelltod der SU-DHL4 Linie induzierten, war Ofa-IgA2.0 sowohl in der mikroskopischen Analyse als auch in der durchflusszytometrischen Untersuchung das am wenigsten effiziente Molekül. Im Vergleich mit ihren parental IgG1-Antikörpern zeigten die IgA2.0-Moleküle keine statistisch signifikanten Unterschiede. Obwohl sich die Raten des von Obi-IgA2.0 und -IgG1 induzierten PCD in einer AnnexinV/7-AAD-Färbung statistisch nicht unterschieden, zeigten sich die von dem Typ II-Antikörper Obinutuzumab vermittelten Aggregationseffekte bereits nach kürzerer Zeit. Das optische Erscheinungsbild der Zellen nach einer Antikörperbehandlung von ca. 4 Stunden zeigte deutlich, dass IgA2.0 Formate der Typ I Antikörper RTX und Ofa eine stärkere Assoziation der Zellen vermittelten als ihre IgG1-Pendants.

Diese Beobachtungen übersetzten sich jedoch nicht in die durchflusszytometrischen Auswertungen, in denen sich die induzierten Zelltodraten von IgA2.0 vs IgG1 nicht unterschieden. Während sowohl der Typ I-Antikörper Rituximab als auch der Typ II-Antikörper Obinutuzumab sowohl als IgA2.0 als auch als IgG1-Format direkte Effekte in den Zielzellen auslösten, waren beide Ofatumumabantikörpervarianten im Vergleich nicht sehr effektiv in Versuchen mit SU-DHL4 Zellen. Wurde eine andere Zelllinie eingesetzt, war Ofa-IgA2.0 effektiver als der dazugehörige IgG1 Antikörper, wenngleich dieser Unterschied auch nicht statistisch signifikant war.

Die Verwendung des Zytoskellinhibitors Latrunculin B und/oder eines Pancaspaseinhibitors zeigte, dass der von CD20-IgA2.0 induzierte PCD aktinabhängig und caspaseunabhängig ist. Beide Merkmale sind Kerncharakteristika des durch CD20 gerichtete Typ II-Antikörper vermittelten Zelltodes (Ivanov *et al*, 2009). Die Inhibitionsexperimente zeigten allerdings, dass der durch Obi-IgG1 induzierte Zelltod nur zum Teil durch Latrunculin B zu inhibieren war. Da alle Antikörper in diesen Versuchen in sättigenden Konzentrationen eingesetzt wurden, ist es denkbar, dass Obi-IgG1 im Vergleich zu den eingesetzten CD20 IgA2.0 Antikörper bereits bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen effektive homotypische Aggregation und PCD zeigt. Eine konzentrationsabhängige Inhibition der durch Obi-IgA2.0 und Obi-IgG1 induzierten homotypischen Aggregation CD20<sup>pos</sup>-Zielzellen kann einen Eindruck geben, bei welchen Antikörperkonzentrationen beide Formate eine mittlere Effektivität zeigen und inwiefern sich diese durch eine Behandlung mit dem Zytoskellinhibitor Latrunculin B blockieren ließe. Eine klare Kategorisierung der generierten CD20-IgA2.0 Antikörper war mithilfe der durchgeführten Untersuchungen nicht vorzunehmen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass RTX- und Obi-IgA2.0 effektiv homotypische Aggregation und PCD von CD20<sup>pos</sup> Zielzellen vermitteln und dass der induzierte Zelltodmechanismus abhängig von einer Umstrukturierung von Aktinfilamenten in der Zellmembran der B-Zellen und caspaseunabhängig abläuft. Sowohl Ofa-IgA2.0 als auch Ofa-IgG1 waren in Versuchen zur homotypischen Aggregation und PCD die am wenigsten effektiven Antikörperformate. Dabei kann das Epitop des Antigens CD20, das von beiden Ofatumumabformaten erkannt wird, deren geringe Effektivität in diesen Versuchen bedingen. An deren Antigen-Antikörper-Wechselwirkung sind Aminosäuren sowohl des großen extrazellulären- als auch des kleinen *loops* des Antigens CD20 beteiligt. Diese besonderen Bindungseigenschaften von Ofatumumab bedingen sowohl dessen langame *Off-rate* vom Antigen als auch seine herausragende CDC Aktivität (Teeling *et al*, 2006, 2004) und kategorisieren den Antikörper daher als klassischen Typ I Antikörper. Während CDC von der veränderten Anordnung von CD20 in der Plasmamembran abhängt (*lipid rafts*), ist homotypische Aggregation von B-Zellen nach Antikörperbehandlung als *lipid raft*-unabhängig beschrieben (Chan *et al*, 2003). Der Austausch der konstanten Region von IgG1 zu IgA2.0 scheint im Fall von Ofatumumab die ineffizient direkt-vermittelten Effekte nicht zu verbessern.

#### 4.3.3 Rekrutierung von PMN Effektorzellen für ADCC

Das Ansteuern aktivierender FcγR durch therapeutische IgG Antikörper wie Rituximab trägt unumstritten zu deren *in vivo* Anti-Tumoreffektivität bei (Clynes *et al*, 2000). Ebenso wie der NK-Zellen exprimierte aktivierende FcR FcγRIIIa exprimieren auch Granulozyten ITAM-tragende Rezeptoren wie FcγRIIa und FcαRI. Im Gegensatz zu FcγRIIIa und FcγRIIa, die hauptsächlich durch IgG Antikörper gebunden und aktiviert werden, wird FcαRI von IgA Antikörpern adressiert und kann IgA-vermittelt Granulozyten für ADCC rekrutieren. Das Potential von Granulozyten als Effektorzellpopulation für ADCC konnte in der Vergangenheit von mehreren Gruppen eindrucksvoll gezeigt werden (Lohse *et al*, 2016, 2017; Pascal *et al*, 2012; Meyer *et al*, 2016; Hart *et al*, 2017; Dechant *et al*, 2007; Rouwendal *et al*, 2016; Boross *et al*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit waren drei verschiedene CD20-gerichtete IgA-Moleküle in der Lage, verschiedene Tumorzelllinien in ADCC Experimenten in Anwesenheit von Granulozyten als Effektoren zu lysieren. Während RTX-IgA2.0 in zwei von zehn untersuchten Zelllinien keine signifikante Lyse induzieren konnte, waren stabilere Lyseraten des untersuchten Obi-IgA2.0 auf allen Zelllinien signifikant im Vergleich zu einem Kontrollantikörper nachweisbar. Obwohl die untersuchten Zelllinien stark unterschiedliche Expressionslevel des Antigens CD20 zeigten, konnte die Höhe der IgA-vermittelte Zelllyse damit nicht korreliert werden (siehe Anhang Abbildung 56). In konzentrationsabhängigen ADCC Versuchen zeigte Obi-IgA2.0 bei geringeren Antikörperkonzentrationen eine überlegene ADCC-Aktivität gegenüber RTX-IgA2.0 und Ofa-IgA2.0. Wurden in ADCC Versuchen MNC-Effektoren eingesetzt, induzierten die IgA Antikörper keine Zelllyse. Obi-IgG1 ist ein humaner, niedrig-fukosylierter CD20-gerichteter Typ II Antikörper, der eine gesteigerte Affinität zu FcγRIIIa und damit eine höhere NK-Zell-vermittelte ADCC Aktivität aufweist (Mössner *et al*, 2010). Obinituzumab war (gefolgt von Ofatumumab und Rituximab) mit MNC-Effektorzellen der effektivste der drei C20 gerichteten IgG1 Antikörper. Erstaunlicherweise übertrug sich das Konzept des effektivsten ADCC Antikörpers auch auf das Obi-IgA2.0 Format. Anders als Obi-IgG1 wurde Obi-IgA2.0 bezüglich der Affinität zu dessen aktivierendem FcR jedoch weder Fc- noch glykooptimiert. Dennoch zeigte Obi-IgA2.0 sowohl unter Verwendung unstimulierter - als auch mit GM-CSF-stimulierten Granulozyten als Effektorzellen in ADCC Versuchen eine signifikant effizientere Tumorzelllyse im Vergleich zu den beiden anderen CD20-gerichteten IgA2.0 Molekülen.

Grund für die effektive ADCC könnte die Orientierung des Antikörpers bei der Bindung an das Antigen sein. Zwar erkennen Rituximab und Obinituzumab überlappende Epitope des CD20 Antigens, dennoch sind verschiedene Aminosäurereste ihrer Kernepitope an der Vermittlung dieser Bindung beteiligt. Beide Antikörper binden CD20 mit einer völlig unterschiedlichen Orientierung (Niederfellner *et al*, 2011). Im Jahr 2012 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe um Christian Klein ein

dreidimensionales Modell der Antikörper Rituximab und Obinutuzumab, das auf der Basis vorhandener kristallografischer Daten und bekannter Konzepte zu Antikörper- und Membrantopologie erstellt wurde. Die leicht variierenden Kernepitope von Rituximab und Obinutuzumab scheinen sich, zumindest im gerechneten Modell, nicht nur enorm auf die Orientierung des F(ab')<sub>2</sub>, sondern auf die des gesamten Antikörpers zu übertragen (Klein *et al*, 2013). Anders als bei Fcγ-Rezeptoren und IgG-Molekülen wird die Bindung von FcαRI an IgA Antikörper mit der distal zur Membran liegenden EC1 Domäne des Rezeptors vermittelt (Craig Morton *et al*, 1999). Außerdem sind an der Bindung eines IgA-Fc-Teils jeweils zwei FcαRI -Moleküle beteiligt (Herr *et al*, 2003). Es wäre denkbar, dass das generierte Obi-IgA2.0 Molekül durch seine veränderte Orientierung zu Antigen und Zelloberfläche nach Antigenbindung leichter zugänglich für den IgA-Fc-Rezeptor FcαRI auf Effektorzellen ist. Möglicherweise können so stabilere Signale durch FcαRI weitergeleitet und ADCC der Zielzellen auch unter ungünstigeren Bedingungen wie niedriger Zielantigendichte oder starker Expression verschiedener Regulatoren induziert werden.

Auch die Beteiligung direkt induzierter Effekte durch die Antikörperbehandlung der Zellen ist denkbar. In <sup>51</sup>Chromfreisetzungsversuchen, in denen Zielzellen zusammen mit CD20-gerichteten Antikörpern ohne Effektorzellen inkubiert wurden, war keine Lyse der Zellen nachweisbar. Dennoch verdeutlichen durchflusszytometrische Experimente zur homotypischen Aggregation und PCD, dass die Inkubation mit CD20-gerichteten Antikörpern einen Einfluss auf die Zielzellpopulation hat. So zeigte zwar ein Großteil der Zellen im Versuch ein negatives Signal für 7-AAD, doch war eine Verlagerung von AnnexinV<sup>neg</sup> hin zu AnnexinV<sup>pos</sup>-Signalen deutlich erkennbar. Mithilfe einer AnnexinV-Färbung können Phosphatidylserinreste erkannt werden, die aufgrund apoptotischer Vorgänge von ihrem sonst permanenten Vorkommen als Teil der intrazellulären Plasmamembran nach außen verlagert werden. Prominente Phosphatidylserine an der Zelloberfläche dienen phagozytären Zellen wie Makrophagen (Verhoven *et al*, 1995) aber auch Neutrophilen (Maugeri *et al*, 2009) als Fresssignal. Die von uns beobachtete AnnexinV<sup>pos</sup>- 7-AAD<sup>neg</sup>-Zellpopulation erscheint in den durchgeführten drei- bis vierstündigen Zytotoxizitätsversuchen ohne Effektorzellen nicht in den Auswertungen. Ausschließlich Zellen, deren Zellmembran durchlässig ist, setzen inkorporiertes <sup>51</sup>Chrom frei und erscheinen ebenfalls in durchflusszytometrischen Untersuchungen als 7-AAD<sup>pos</sup> (da 7AAD ein DNA-Marker ist). Aufgrund der Verlagerung der Zellpopulation in durchflusszytometrischen Untersuchungen ist anzunehmen, dass AnnexinV<sup>pos</sup>- 7-AAD<sup>neg</sup>-Zellen ein ideales Ziel für phagozytäre Effektorzellen darstellen. In Anwesenheit von PMN-Effektoren ist es denkbar, dass in <sup>51</sup>Chromfreisetzungsassays nicht nur Fc-FcR-vermittelte ADCC sichtbar wird, sondern auch direkt induzierte Effekte der Antikörper, wie homotypische Aggregation, indirekt zu einer Aktivierung verschiedener Effektoren des phagozytären Kompartiments führt.



#### 4.3.4 Durch CD20-gerichtete IgA Antikörper induzierte CDC in CD20<sup>pos</sup> Tumorzelllinien

Obwohl IgA Antikörper in ihrem Fc-Teil kein Bindungsmotiv für das C1q-Molekül tragen, konnte bereits in einer Studie aus dem Jahr 2012 Komplementaktivierung durch CD20-gerichtete IgA Antikörper gegen CD20<sup>pos</sup> Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Pascal *et al*, 2012). Auch ein 1F5-IgA2wt Antikörper rekrutierte das Komplementsystem effektiv zur Tumorzelllyse. Anhand von Untersuchungen von Zeit- und Temperaturkinetik sowie zur Abhängigkeit der IgA-vermittelten CDC von der eingesetzten Serumkonzentration wurde eine alternative Komplementaktivierung angenommen (Lohse *et al*, 2017). Zusätzlich ist eine MBL-abhängige Initiation der Komplementkaskade eines HER-2-gerichteten IgA Antikörper beschrieben, wobei dimere und polymere IgA-Formate signifikant besser an MBL banden als monomere Antikörper (Roos *et al*, 2001).

Die von uns untersuchten optimierten CD20-gerichteten IgA-Moleküle zeigten gegenüber einer Auswahl eingesetzter Tumorzelllinien nur begrenzt CDC Aktivität. Dabei induzierten die jeweiligen parentalen IgG1-Moleküle konzentrationsabhängig signifikant effizientere CDC im Vergleich zu den spezifischen IgA2.0 Molekülen. Wurden SU-DHL4 Zellen als Zielzellen eingesetzt, waren RTX- und Ofa-IgA2.0 gleich effektiv in der Vermittlung von CDC. Die durch Obi-IgA2.0 vermittelte CDC war auf allen Zelllinien schwach und verbesserte sich auch mit steigender Antikörperkonzentration nicht wesentlich. Die variablen Regionen des Typ II-Antikörpers Obinutuzumab führt zu einer schwachen Aktivierung des Komplementsystems, was sich auch durch den Austausch der konstanten Antikörperregion (von IgG1 zu IgA.0) nicht änderte. Der Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte der konzentrationsabhängigen spezifischen Zelllysen zeigt eine verhältnismäßige CDC Aktivität der Antikörperpaare, die dieselbe konstante Region tragen. Dabei haben Antikörper mit der variablen Region von Ofatumumab die niedrigsten-, Rituximab Formate die zweitniedrigsten und Obi-IgA2.0/-IgG1 Antikörper die höchsten EC<sub>50</sub>-Werte. Antikörper, die die Fähigkeit besitzen, das Antigen CD20 in sog. *lipid rafts* zu organisieren, sind bekanntermaßen starke Vermittler von CDC (Cragg *et al*, 2003).

Durchflusszytometrische Untersuchung zur Antikörper-vermittelten Bindung des Initiationsmoleküles C1q zeigte die durch IgG1-Antikörper vermittelte klassische Komplementaktivierung deutlich. Ofa-IgG1 band im Vergleich zu einem Kontrollmolekül signifikant C1q nach der Inkubation mit CD20<sup>pos</sup> Zielzellen, wobei in diesem Versuchsablauf nicht zwischen antikörpergebundenem und zellgebundenem C1q unterschieden werden kann. Keines der untersuchten IgA-Formate zeigte ein spezifisches Signal einer C1q-Bindung. Auch das von Engelberts *et al*. vorgestellte Konzept des akzessorischen CDC basiert auf einer sekundären Fixierung von C1q durch in *lipid rafts* geclusterte BCR-Moleküle (Engelberts *et al*, 2016). Die C1q-Abhängigkeit des Konzeptes vom akzessorischen Bypass konnte mit IgA-Molekülen nicht nachgewiesen werden. Während C1q ausschließlich Teil des klassischen Weges des Komplementsystems (oder des akzessorischen Bypass CDC) ist, kann der

Nachweis von C4b Aufschluss auf die Beteiligung von sowohl klassischer als auch MBL-vermittelter Komplementaktivierung geben.

IgA Antikörper tragen im Gegensatz von bspw. IgG1 Antikörpern eine stärker exponierte N-Glykosylierung. MBL, das strukturell dem C1q Molekül sehr ähnlich ist, erkennt und bindet Zuckerstrukturen wie D-Mannose, L-Fucose und N-Acetylglucosamin (Turner, 1996). Lektinweg-vermittelte Komplementaktivierung konnte in Patienten nachgewiesen werden, die unter sog. IgA-Nephropathie, der häufigsten Form der Glomerulonephritis leiden, bei der es zu Ablagerungen veränderter IgA1-Antikörper in der Niere kommt, die langfristig zu einer Niereninsuffizienz führen. In Depositionsexperimenten auf Mesangiozyten von IgA-Nephropathiepatienten konnte keine Bindung von C1q, aber die Bindung von C3 und C4 auf den Zellen nachgewiesen werden (Miyazaki *et al*, 1984). Die Autoren schlussfolgerten, dass die Deposition von C3 durchaus durch eine alternative Komplementaktivierung erklärt werden könne. Da C4 jedoch ausschließlich Teil der Kaskade von klassischer Aktivierung und Lektinweg ist und später auch die Deposition von MBL auf Mesangiozyten nachgewiesen werden konnte (Matsuda *et al*, 1998), schien es plausibel, dass aberrante IgA Moleküle in Patienten, die unter IgA-Nephropathie leiden, komplementvermittelte Lyse von Zellen über den Lektinweg aktivieren können. Prinzipiell ist eine MBL-vermittelte CDC auch für therapeutische IgA Antikörper denkbar, weshalb in einem letzten Schritt die in dieser Arbeit generierten CD20-gerichteten IgA Antikörper auf ihre Fähigkeit zur C4b-Deposition auf CD20<sup>pos</sup> Zellen untersucht wurden. MFI-Werte der durchflusszytometrischen C4b-Deposition zeigte, dass sich die drei CD20-IgA Antikörper voneinander unterschieden. So zeigte RTX-IgA2.0 die höchste, Obi-IgA2.0 die zweithöchste und Ofa-IgA2.0 die niedrigste C4b-Deposition auf SU-DHL4 Zellen. Im Vergleich zu einem Kontrollmolekül war die durch CD20-gerichtete IgA Antikörper vermittelte C4b Deposition jedoch statistisch nicht signifikant. Ergebnisse aus den C4b-Depositionsversuchen ließen sich in Zytotoxizitätsversuchen nicht auf die von den Antikörpern induzierten Lyseraten übertragen. In welchem Maß alternative Komplementaktivierung, Aktivierung des Lektinweges oder auch indirekte Anlagerung von C1q durch den sog. Bypass CDC an der durch IgA Antikörper vermittelte CDC beteiligt sind, lässt sich nicht eindeutig feststellen.

#### **4.4 Typ I oder Typ II: Wie können die generierten IgA-Moleküle kategorisiert werden?**

Die therapeutische Effektivität einer CD20-gerichteten Antikörpertherapie wird durch den Erfolg des chimären Antikörpers Rituximab bestätigt. CD20 gerichtete Antikörper werden aufgrund ihrer Bindungseigenschaften an das Antigen und ihrer funktionellen Eigenschaften entweder in Typ I oder Typ II Antikörper eingeteilt, wobei alle zugelassenen CD20 Antikörper über die Fähigkeit verfügen, Zielzellen mittels ADCC zu lysieren (zusammengefasst in: Boross & Leusen, 2012; Beers *et al*, 2010). Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Wechsel der konstanten Region dreier

zugelassener CD20-gerichteter Antikörper von IgG1 zu IgA2.0 Auswirkungen auf deren jeweiligen Typ I oder Typ II Charakteristika hatte. Zunächst zeigten alle drei IgA-Moleküle die effektive Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Tumorzelllyse, wobei Obi-IgA2.0 eine den beiden anderen IgA2.0-Formaten überlegene ADCC aufwies. Die von Typ I Antikörpern abstammenden IgA-Formate RTX-IgA2.0 und Ofa-IgA2.0 verfügten durch den Wechsel der konstanten Domäne über verbesserte direkte Effektorfunktionen wie homotypische Aggregation und PCD als die jeweiligen parentalen Ausgangsmoleküle. Dabei zeigte der von den IgA Antikörpern induzierte Zelltod nachweislich Typ II Eigenschaften (aktinvermittelt und caspaseunabhängig). Jedoch war keiner der drei CD20 IgA Antikörper dem Typ II Obi-IgG1 Molekül überlegen. Auch eine Berücksichtigung der Fähigkeit der Antikörper, CDC in Zielzellen zu vermitteln, die für Typ I Antikörper als charakteristisch definiert ist, erleichtert die Einteilung der generierten IgA Moleküle nicht. Zwar war der Typ II Antikörper Obi-IgG1 und dessen -IgA2.0 Format ineffektiv CDC Experimenten, doch übertrug sich das Konzept der Typ I Antikörper Rituximab und Ofatumumab, die starke CDC gegen Tumorzellen vermitteln, nicht automatisch auf deren IgA2.0 Formate. Das Konzept von Typ I und Typ II Antikörpern lässt sich nicht einfach auf Antikörper übertragen, die zwar gleiche variable, dafür aber unterschiedliche konstante Regionen tragen. Die IgA Antikörper präsentieren sich eher als eine Mischung zwischen Typ I und Typ II Antikörpern, indem sie zwar effektiv PMN Effektorzellen für ADCC rekrutieren, dafür aber anders als die parentalen IgG1-Moleküle sowohl CDC als auch direkte Effekte nur mit intermediärer Effizienz vermitteln.

## 4.5 Zukünftige Vorhaben

### 4.5.1 Mechanismen der von CD20-gerichteten IgA Antikörpern vermittelten CDC verstehen

Bisher konnte eine Beteiligung des Lektinweges an der IgA-vermittelten CDC nicht direkt gezeigt werden. In Studien aus den 1990er und frühen 2000er Jahren wurde MBL zumeist aus dem Serum gesunder Spender gereinigt, um mittels ELISA eine Bindung des gereinigten MBL an IgA Antikörper nachweisen zu können (Roos *et al*, 2001). Zwar werden in unserer Arbeitsgruppe Experimente mit depletierten Seren der Firma *Complement Technology Inc.* durchgeführt, doch anders als bspw. C1q oder C4 depletierte Seren sind MBL-defiziente Seren nicht kommerziell zu erwerben. Zusätzlich könnten auch Seren MBL-defizienter Individuen (NIH U.S. National Library of Medicine, 2012), die im Vergleich zu aufgereinigten Seren gesunder Spender in CDC Versuchen eingesetzt werden, Aufschluss über den Beitrag des Lektinweges an der CDC-Aktivität von IgA Antikörpern geben. In einem ersten Schritt sollen zudem Versuche mit MBL-gerichteten Antikörpern zeigen, ob sich eine IgA-vermittelte Deposition von MBL durchflusszytometrisch auf Zielzellen nachweisen lässt. Dazu müssen verschiedene neue fluoreszenzmarkierte anti-MBL-Antikörper auf ihre Funktionalität untersucht werden.

Um zu analysieren, ob akzessorische CDC auch durch IgA Antikörper vermittelt werden kann, sollen transgene CD20<sup>pos</sup> CHO K1 Zellen mit für humane IgG/IgM BCR kodierende Expressionskonstrukte transfiziert werden, um in diesem Modell nachweisen zu können, inwiefern die Anwesenheit eines BCR die CDC-Eigenschaften der Moleküle beeinflusst. Auch die Herstellung von BCR<sup>ko</sup>-Mutanten bereits untersuchter B-Zelllinien wie SU-DHL4 oder Daudi können einen Beitrag zum Verständnis der Wirkmechanismen der untersuchten Antikörper leisten. Da der Beitrag des Komplementsystems zur therapeutischen Effektivität von CD20-Antikörpern weiterhin umstritten bleibt, ist eine Optimierung von IgA-Molekülen sowohl in die eine als auch die andere Richtung vorstellbar.

#### 4.5.2 Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität der generierten Antikörper

In der Vergangenheit zeigte ein CD20-spezifisches 1F5-IgA2 Molekül *in vivo* Aktivität in einem B-Zelldepletionsmodell. Dabei zeigte der IgA2 Antikörper in Mäusen vergleichbare Effektivität wie das parentale 1F5-IgG1 Molekül (Lohse *et al*, 2017). Unter Verwendung verschiedener transgener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von IgA Antikörpern nicht signifikant von der Anwesenheit eines humanen Fc $\alpha$ RI oder von der eines aktiven Komplementsystems abhing. Zusätzliche Untersuchungen zur Beteiligung des Fc Rezeptors Fc $\alpha$ / $\mu$ R zeigten eine verschlechterte antikörpervermittelte zelluläre Phagozytoseaktivität der Antikörper nach Fc $\alpha$ / $\mu$ R-Blockade (unpublizierte Daten). Fc $\alpha$ / $\mu$ R ist ein Fc Rezeptor für IgA und IgM, wird auf Makrophagen und gereiften B-Zellen exprimiert (Shibuya *et al*, 2000). Eine Studie zeigt, dass der Rezeptor die Endozytose IgM-umhüllter Bakterien durch B-Lymphozyten vermittelt (Sakamoto *et al*, 2001). Die Relevanz unterschiedlicher Effektorfunktionen von IgA Antikörpern in der Tumorthherapie sind somit nur oberflächlich verstanden. Das Ziel zukünftiger *in vivo* Untersuchungen soll es daher sein, die Bedeutung der verschiedenen Effektormechanismen IgA-vermittelter anti-Tumoreffekte aufzuklären, um indikationsbedingt zwischen verschiedenen Antikörperformaten und Antigenspezifitäten auswählen zu können. Natürlich sollen auch Versuche zur Pharmakokinetik der generierten Moleküle durchgeführt werden. Ähnlich wie in der Veröffentlichung von (Lohse *et al*, 2016) sind die in dieser Arbeit hergestellten CD20-gerichteten IgA Antikörper sowohl protein- als auch glykooptimiert. Ziel dieser und anderer Optimierungsstrategien ist eine Verbesserung der Serumhalbwertszeiten von IgA Antikörpern, um deren therapeutisches Potential auszuschöpfen. Um den Erfolg der vorgenommenen Optimierungsstrategien zu verifizieren, sollen Serumhalbwertszeiten im Vergleich zu IgA Wildtypmolekülen ermittelt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Zulassung des CD20-gerichteten chimären IgG1 Antikörpers Rituximab verändert die Therapie verschiedenster B-Zellmalignitäten bis heute grundlegend. Im Vergleich zu anderen IgG-Subklassen zeigten IgG1 Antikörper potente ADCC und CDC Effektivität und werden seither biotechnologisch und funktionell für klinische Anwendungen weiterentwickelt und optimiert. Mittlerweile befinden sich drei CD20-IgG1 Antikörper in der klinischen Anwendung zur Behandlung onkologischer Erkrankungen, die sich in Bezug auf die von ihnen vermittelten Antitumoreffekte in sog. Typ I und Typ II Antikörper kategorisieren lassen. Im Gegensatz zu IgG1 Antikörpern übernehmen monomere, dimere und polymere IgA Antikörper eine entscheidende Rolle im Bereich der mukösen Immunabwehr und leisten einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung von Pathogenen. Anders als IgG1-Antikörper, die über Fc/FcγR-Interaktionen besonders effizient bspw. NK-Zellen als Effektorzellen für ADCC rekrutieren, vermitteln IgA Antikörper durch die Bindung an FcαRI zwar ebenfalls ADCC, dabei aktivieren sie jedoch besonders effektiv Granulozyten. Das zytotoxische Potential therapeutischer IgA Antikörper, die verschiedene Tumorantigene adressieren, wurde sowohl *in vitro* als auch in *in vivo* bereits von mehreren Arbeitsgruppen eindrucksvoll gezeigt.

Ziel dieser Arbeit war es, drei optimierte IgA Moleküle herzustellen, die die variablen Regionen der bereits in der Klinik zugelassenen IgG1 Antikörper Rituximab (RTX), Ofatumumab (Ofa) und Obinutuzumab (Obi) tragen. Die Moleküle sollten in Bezug auf ihre funktionellen Eigenschaften untereinander, aber auch mit den jeweiligen parentalen IgG1 Molekülen verglichen werden. In Bezug auf Fab-vermittelte Effekte wie homotypische Aggregation und Induktion von programmiertem Zelltod unterschieden sich IgA2.0 und IgG1 Moleküle nicht voneinander. Der durch Typ II-CD20 Antikörper vermittelte Zelltodmechanismus ist als aktinvermittelt und caspaseunabhängig beschrieben und konnte nicht nur für den Typ II-Antikörper Obinutuzumab, sondern auch für die CD20-gerichteten IgA2.0 Moleküle nachgewiesen werden. Alle untersuchten CD20-gerichteten Antikörper depletierten zuverlässig B-Zellen aus humanem Vollblut, wobei die Obinutuzumabvarianten eine statistisch signifikant höhere Effektivität im Vergleich zu Rituximabvarianten zeigten. Alle drei CD20-gerichteten IgA2.0 Antikörper rekrutierten PMN als Effektorzellen für ADCC. Die IgA-vermittelte ADCC ließ sich durch eine Aktivierung der PMN Effektoren mit GM-CSF steigern. Während Typ I IgG1-Antikörper wie Rituximab und Ofatumumab zuverlässig das Komplementsystem zur Tumorzelllyse rekrutieren, zeigten die jeweiligen IgA2.0 Varianten (RTX-IgA2.0 und Ofa-IgA2.0) nur geringe CDC-Aktivität. Zusätzlich vermittelten CD20-IgA2.0-Antikörper in Anwesenheit von humanem Serum weder C1q-Bindung noch C4b-Desposition auf CD20-positiven Tumorzellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CD20-gerichtete IgA Antikörper sowohl Typ I als auch Typ II Eigenschaften aufwiesen und zusätzlich effektiv Granulozyten für ADCC rekrutierten. Das

Konzept von Typ I- und Typ II-CD20 Antikörpern, das für IgG1 beschrieben ist, ließ sich daher nicht auf CD20 IgA Antikörperformate übertragen. CD20-gerichtete IgA Antikörper zeigen somit Hybrideigenschaften beider CD20 Antikörpertypen und sind besonders aufgrund ihrer Fähigkeit, Granulozyten effizient als Effektorzellen für ADCC zu rekrutieren, als therapeutische Formate für die Antikörpertherapie interessant.

## 6. Summary

The FDA approval of the CD20 IgG1 antibody rituximab for the treatment of B-cell malignancies in 1997 broadened the therapy options for many lymphoma patients. IgG1 antibodies are known to activate effector cells for ADCC and the complement system for CDC against tumor cells more efficiently than other IgG subclass antibodies. Because of their superior and unique features, biotechnological and functional development of IgG1 antibodies for therapeutic applications is a major issue of current translational research. To date, four CD20 IgG1 antibodies are on the market, with three of them being approved for leukemias and lymphomas. Depending on the anti-tumor effects that are initiated by these molecules, CD20-antibodies are categorized in type I and type II. Although IgA antibodies play a crucial role in blood and mucosal immunity against pathogens and are considered as an alternative isotype for antibody based tumor therapy, no IgA antibody has been approved for clinical applications so far. In contrast to IgG1 antibodies, which activate NK-cells via Fc/FcγR-interactions, IgA antibodies can efficiently recruit granulocytes via Fc/FcαRI-interactions for ADCC. Cytolytic potential of IgA antibodies recognizing different tumor antigens *in vitro* and in mice has been demonstrated in various studies.

Aim of this thesis was to generate three optimized CD20 targeting IgA antibodies using the variable regions derived from the FDA approved IgG1 antibodies rituximab, ofatumumab or obinutuzumab. Functional properties of the CD20-IgA2.0 antibodies should be compared with each other and with their corresponding parental IgG1 molecules. Regarding the Fab mediated functions such as homotypic aggregation and programmed cell death no statistically significant differences were observed between IgA2.0 and IgG1 molecules. Type II CD20 antibodies like obinutuzumab can mediate programmed cell death which is defined as actin-dependent and caspase-independent. CD20-IgA2.0 antibodies mediated programmed cell death in a type II CD20 antibody manner. All analyzed CD20 directed antibodies depleted B-cells from human whole blood efficiently, whereby variants carrying the variable regions from obinutuzumab were statistical significantly more efficient than rituximab variants. RTX-IgA2.0, Ofa-IgA2.0 and Obi-IgA2.0 recruited PMN for ADCC and higher levels of ADCC were reached when PMN were treated with GM-CSF. Reliable levels of CDC in CD20<sup>pos</sup> lymphoma cell lines were induced by type I CD20 IgG1 antibodies rituximab and ofatumumab. IgA antibodies carrying the variable regions of rituximab or ofatumumab showed low activation of the complement cascade as measured in <sup>51</sup>chromium release assays and in C1q or C4b deposition experiments using CD20<sup>pos</sup> target cells and flow cytometry.

In conclusion, the concept of type I and type II antibodies, which is established for IgG1 molecules targeting the CD20, antigen cannot be simply transferred to antibodies that carry IgA sequence motifs within their constant regions. IgA antibodies directed against CD20 revealed hybrid features

regarding their categorization into type I or type II. Due to their ability to efficiently recruit granulocytes for ADCC they may represent an attractive format for antibody based immunotherapy of leukemias or lymphomas.



## 8. Literaturverzeichnis

- Alduaij, W., Ivanov, A., Honeychurch, J., Cheadle, E.J., Potluri, S., Lim, S.H., Shimada, K., Chan, C.H.T., Tutt, A., Beers, S.A., Glennie, M.J., Cragg, M.S. & Illidge, T.M. (2011) **Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies.** *Blood*, **117**, 4519.
- Anderson, D.R., Hanna, N., Newman, R.A., Rastetter, W. & Reff, M.E. **Chimeric and radiolabelled antibodies specific to human CD20 antigen and use thereof for treatment of B-cell lymphoma.** Patent
- Atkin, J.D., Pleass, R.J., Owens, R.J. & Woof, J.M. (1996) **Mutagenesis of the human IgA1 heavy chain tailpiece that prevents dimer assembly.** *The Journal of Immunology*, **157**, 156.
- Baadsgaard, O.D.M.S., Glennie, M., Huang, H., Parren, P.W.H.I., Petersen, J., Ruuls, S., Teeling, J. & van de Winkel, J.G.J. **Human monoclonal antibodies against CD20.** Patent
- Barth, M.J., Mavis, C., Czuczman, M.S. & Hernandez-Ilizaliturri, F.J. (2015) **Ofatumumab exhibits enhanced *in vitro* and *in vivo* activity compared to rituximab in preclinical models of mantle cell lymphoma.** *Clinical Cancer Research*, **21**, 4391.
- Beers, S., Chan, C., French, R., Cragg, M. & Glennie, M. (2010) **CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies.** *Semin Hematol.*, **47(2)**, 107–14.
- Beers, S.A., Chan, C.H.T., James, S., French, R.R., Attfield, K.E., Brennan, C.M., Ahuja, A., Shlomchik, M.J., Cragg, M.S. & Glennie, M.J. (2008) **Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation.** *Blood*, **112**, 4170.
- Beers, S.A., Cragg, M.S. & Glennie, M.J. (2009) **Complement: help or hindrance?** *Blood*, **114**, 5567.
- Beum, P.V., Lindorfer, M.A., Beurskens, F., Stukenberg, P.T., Lokhorst, H.M., Pawluczko, A.W., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J. & Taylor, R.P. (2008) **Complement activation on B lymphocytes opsonized with rituximab or ofatumumab produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis.** *The Journal of Immunology*, **181**, 822.
- Beum, P.V., Peek, E.M., Lindorfer, M.A., Beurskens, F.J., Engelberts, P.J., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J. & Taylor, R.P. (2011) **Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells.** *The Journal of Immunology*, **187**, 3438.
- Beyer, T., Lohse, S., Berger, S., Peipp, M., Valerius, T. & Dechant, M. (2009) **Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies.** *Journal of Immunological Methods*, **346**, 26–37.
- Bindon, C.I., And, G.H. & Waldmann, H. (1988) **Importance of antigen specificity for complement-mediated lysis by monoclonal antibodies.** *European Journal of Immunology*, **18**, 1507–1514.
- Bonavida, B. (2007) **Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions.** *Oncogene*, **26**, 3629–3636.
- Boross, P., Jansen, J.M., de Haij, S., Beurskens, F.J., van der Poel, C.E., Bevaart, L., Nederend, M., Golay, J., van de Winkel, J.G., Parren, P.W. & Leusen, J.H. (2011) **The *in vivo* mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden.** *Haematologica*, **96**, 1822–1830.
- Boross, P. & Leusen, J.H.W. (2012) **Mechanisms of action of CD20 antibodies.** *American Journal of Cancer Research*, **2**, 676–690.
- Boross, P., Lohse, S., Nederend, M., Jansen, J.H.M., van Tetering, G., Dechant, M., Peipp, M., Royle, L., Liew, L.P., Boon, L., van Rooijen, N., Bleeker, W.K., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J., Valerius, T. & Leusen, J.H.W. (2013) **IgA EGFR antibodies mediate tumour killing *in vivo*.** *EMBO Molecular Medicine*, **5**, 1213.
- Boulianne, G.L., Hozumi, N. & Shulman, M.J. (1984) **Production of functional chimaeric mouse/human antibody.** *Nature*, **312**, 643–646.

- Bournazos, S., Woof, J., Hart, S. & Dransfield, I. (2009) **Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants.** *Clinical and experimental immunology*, **157**, 244–54.
- Brandtzaeg, P. & Prydz, H. (1984) **Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins.** *Nature*, **311**, 71–73.
- Brinkmann, U. & Kontermann, R.E. (2017) **The making of bispecific antibodies.** *mAbs*, **9**, 182–212.
- Brooks, DG., Qiu, WQ., Luster, AD., Ravetch, J. (1989) **Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes.** *Journal of Experimental Medicine*. Oct 1;**170**(4):1369–85.
- Brüggemann, M., Osborn, M.J., Ma, B., Hayre, J., Avis, S., Lundstrom, B. & Buelow, R. (2015) **Human antibody production in transgenic animals.** *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **63**, 101–108.
- Brüggemann, M., Williams, G.T., Bindon, C.I., Clark, M.R., Walker, M.R., Jefferis, R., Waldmann, H. & Neuberger, M.S. (1987) **Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies.** *The Journal of Experimental Medicine*, **166**, 1351.
- Brunke, C., Lohse, S., Derer, S., Peipp, M., Boross, P., Kellner, C., Beyer, T., Dechant, M., Royle, L., Liew, L.P., Leusen, J.H. & Valerius, T. (2013) **Effect of a tail piece cysteine deletion on biochemical and functional properties of an epidermal growth factor receptor-directed IgA2 m(1) antibody.** *mAbs*, **5**, 936–945.
- Bubien, J., Zhou, L., Bell, P., Frizzell, R. & Tedder, T. (1993) **Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B lymphocytes.** *The Journal of Cell Biology*, **121**, 1121–1132.
- Carayannopoulos, L., Hexham, J.M. & Capra, J.D. (1996) **Localization of the binding site for the monocyte immunoglobulin (Ig) A-Fc receptor (CD89) to the domain boundary between Ca2 and Ca3 in human IgA1.** *The Journal of Experimental Medicine*, **183**, 1579.
- Chan, H.T.C., Hughes, D., French, R.R., Tutt, A.L., Walshe, C.A., Teeling, J.L., Glennie, M.J. & Cragg, M.S. (2003) **CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts.** *Cancer Research*, **63**, 5480.
- Chang, H., Messner, H.A., Wang, X.H., Yee, C., Addy, L., Meharchand, J. & Minden, M.D. (1992) **A human lymphoma cell line with multiple immunoglobulin rearrangements.** *Journal of Clinical Investigation*, **89**, 1014–1020.
- Cheadle, E.J., Sidon, L., Dovedi, S.J., Melis, M.H.M., Alduaij, W., Illidge, T.M. & Honeychurch, J. (2013) **The induction of immunogenic cell death by type II anti-CD20 monoclonal antibodies has mechanistic differences compared with type I rituximab.** *British Journal of Haematology*, **162**, 842–845.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G. & Ravetch, J.V. (2000) **Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets.** *Nat Med*, **6**, 443–446.
- Coiffier, B., Haioun, C., Ketterer, N., Engert, A., Tilly, H., Ma, D., Johnson, P., Lister, A., Buske, M.F., Radford, J.A., Capdeville, R., Diehl, V. & Reyes, F. (1998) **Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study.** *Blood*, **92**, 1927.
- Coiffier, B., Lepage, S., Pedersen, L.M., Gadeberg, O., Fredriksen, H., van Oers, M.H.J., Wooldridge, J., Kloczko, J., Holowiecki, J., Hellmann, A., Walewski, J., Flensburg, M., Petersen, J. & Robak, T. (2008) **Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study.** *Blood*, **111**, 1094.
- Coleman M (1985) **Chemotherapy for large-cell lymphoma: Optimism and caution.** *Annals of Internal Medicine*, **103**, 140–142.
- Cooper, N. (1985) **The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component.** *Advances in immunology*, **37**, 151–216.

- Cosimi, A.B., Colvin, R.B., Burton, R.C., Rubin, R.H., Goldstein, G., Kung, P.C., Hansen, W.P., Delmonico, F.L. & Russell, P.S. (1981) **Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts.** *New England Journal of Medicine*, **305**, 308–314.
- Cragg, M.S. (2011) **CD20 antibodies: doing the time warp.** *Blood*, **118**, 219.
- Cragg, M.S. & Glennie, M.J. (2004) **Antibody specificity controls *in vivo* effector mechanisms of anti-CD20 reagents.** *Blood*, **103**, 2738.
- Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T.C., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W.M., French, R.R. & Glennie, M.J. (2003) **Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts.** *Blood*, **101**, 1045.
- Craig Morton, H., van Zandbergen, G., van Kooten, C., Howard, C.J., van de Winkel, J.G.J. & Brandtzaeg, P. (1999) **Immunoglobulin-binding sites of human Fc $\alpha$ RI (CD89) and bovine Fc $\gamma$ 2R are located in their membrane-distal extracellular domains.** *The Journal of Experimental Medicine*, **189**, 1715.
- Daubeuf, S., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., Joly, E. & Hudrisier, D. (2010) **The direction of plasma membrane exchange between lymphocytes and accessory cells by trogocytosis is influenced by the nature of the accessory cell.** *The Journal of Immunology*, **184**, 1897.
- Dechant, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Weisner, W., Peipp, M., van de Winkel, J.G.J. & Valerius, T. (2007) **Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor.** *The Journal of Immunology*, **179**, 2936.
- Dechant, M., Vidarsson, G., Stockmeyer, B., Repp, R., Glennie, M.J., Gramatzki, M., van de Winkel, J.G.J. & Valerius, T. (2002) **Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing.** *Blood*, **100**, 4574.
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M. & Golay, J. (2003) **Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab *in vivo*.** *The Journal of Immunology*, **171**, 1581.
- Dotan, E., Aggarwal, C. & Smith, M.R. (2010) **Impact of rituximab (Rituxan) on the treatment of B-cell Non-Hodgkin's lymphoma.** *Pharmacy and Therapeutics*, **35**, 148–157.
- Drugbank (2014) Identification: **Obinutuzumab.**  
Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08935> [Accessed November 7, 2017].
- Drugbank (2008) Identification: **Ofatumumab.**  
Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06650> [Accessed November 7, 2017].
- Drugbank (2005) Identification: **Rituximab.**  
Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00073> [Accessed November 7, 2017].
- D'Souza, A.A. & Devarajan, P.V. (2015) **Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting — Strategies and applications.** *Journal of Controlled Release*, **203**, 126–139.
- van Egmond, M., van Vuuren, A.J.H., Morton, H.C., van Spriel, A.B., Shen, L., Hofhuis, F.M.A., Saito, T., Mayadas, T.N., Verbeek, J.S. & van de Winkel, J.G.J. (1999) **Human immunoglobulin A receptor (Fc $\alpha$ RI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR  $\gamma$  chain and CR3 (CD11b/CD18).** *Blood*, **93**, 4387.
- Engelberts, P.J., Voorhorst, M., Schuurman, J., van Meerten, T., Bakker, J.M., Vink, T., Mackus, W.J.M., Breij, E.C.W., Derer, S., Valerius, T., van de Winkel, J.G.J., Parren, P.W.H.I. & Beurskens, F.J. (2016) **Type I CD20 antibodies recruit the B cell receptor for complement-dependent lysis of malignant B cells.** *The Journal of Immunology*, **197**, 4829.
- Epstein, A.L., Herman, M.M., Kim, H., Dorfman, R.F. & Kaplan, H.S. (1976) **Biology of the human malignant lymphomas III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse.** *Cancer*, **37**, 2158–2176.
- Frenzel, A., Kügler, J., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Hust, M. & Dübel, S. (2017) **Designing human antibodies by phage display.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **44**, 312–318.
- Frenzel, A., Schirrmann, T. & Hust, M. (2016) **Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy.** *mAbs*, **8**, 1177–1194.

- Gaboriaud, C., Frachet, P., Thielens, N.M. & Arlaud, G.J. (2011) **The human C1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands.** *Frontiers in Immunology*, **2**, 92.
- Gale, R.P. & Zigelboim, J. (1975) **Polymorphonuclear leukocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity.** *The Journal of Immunology*, **114**, 1047.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2016) **Immunogenic cell death in cancer and infectious disease.** *Nat Rev Immunol.* 2017 Feb;**17(2)**:97-111. doi: 10.1038/nri.2016.107.
- GlaxoSmithKline plc (2013) GSK to discontinue manufacture and sale of the BEXXAR® Therapeutic Regimen (tositumomab and iodine I 131 tositumomab). Available at: <http://ca.gsk.com/en-ca/media/press-releases/2013/sk-to-discontinue-manufacture-and-sale-of-the-bexxar-therapeutic-regimen-tositumomab-and-iodine-i-131-tositumomab/> [Accessed November 7, 2017].
- Glennie, M.J., French, R.R., Cragg, M.S. & Taylor, R.P. (2007) **Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies.** *Xlth European meeting on Complement in Human Disease*, **44**, 3823–3837.
- Goede, V., Fischer, K., Engelke, A., Schlag, R., Lepretre, S., Montero, L.F.C., Montillo, M., Fegan, C., Asikanus, E., Humphrey, K., Fingerle-Rowson, G. & Hallek, M. (2015) **Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study.** *Leukemia*, **29**, 1602–1604.
- Golay, J., Da Roit, F., Bologna, L., Ferrara, C., Leusen, J.H., Rambaldi, A., Klein, C. & Introna, M. (2013) **Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab.** *Blood*, **122**, 3482.
- Golay, J.T., Clark, E.A. & Beverley, P.C. (1985) **The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle.** *The Journal of Immunology*, **135**, 3795.
- Gomes, M.M., Wall, S.B., Takahashi, K., Novak, J., Renfrow, M.B. & Herr, A.B. (2008) **Analysis of IgA1 N-glycosylation and its contribution to FcαRI binding.** *Biochemistry*, **47**, 11285–11299.
- Grabar, P. & Williams, C.A. (1953) **Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **10**, 193–194.
- Green, D.J. & Press, O.W. (2017) **Whither radioimmunotherapy: To be or not to be?** *Cancer Research*, **77**, 2191.
- Green, L., Hardy, M., Maynard-Currie, C., Tsuda, H., Louie, D., Mendez, M., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D., Zeng, Y., David, N., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D., Hales, J., McGuinness, R., Capon, D., Klapholz, S. & Jakobovits, A. (1994) **Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs.** *Nature Genetics*, **7(1)**, 13–21.
- Grodzki, A.C. & Berenstein, E. (2010) **Antibody Purification: Affinity Chromatography – Protein A and Protein G Sepharose.** In *Immunocytochemical Methods and Protocols*, Oliver C & Jamur MC (eds) pp 33–41. Totowa, NJ: Humana Press Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_5).
- Groth-Pedersen, L., Ostenfeld, M.S., Høyer-Hansen, M., Nylandsted, J. & Jäätelä, M. (2007) **Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine.** *Cancer Research*, **67**, 2217.
- Guillerey, C., Huntington, N.D. & Smyth, M.J. (2016) **Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy.** *Nat Immunol*, **17**, 1025–1036.
- Halpern, M.S. & Koshland, M.E. (1970) **Novel Subunit in Secretory IgA.** *Nature*, **228**, 1276–1278.
- Hamid, O., Hoffner, B., Gasal, E., Hong, J. & Carvajal, R.D. (2017) **Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **66**, 1249–1264.
- Hamre, R., Farstad, I.N., Brandtzaeg, P. & Morton, H.C. (2003) **Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR γ chain on myeloid cells in blood and tissue.** *Scandinavian Journal of Immunology*, **57**, 506–516.

- Hara, M., Nakanishi, H., Tsujimura, K., Matsui, M., Yatabe, Y., Manabe, T. & Tatematsu, M. (2008) **Interleukin-2 potentiation of cetuximab antitumor activity for epidermal growth factor receptor-overexpressing gastric cancer xenografts through antibody-dependent cellular cytotoxicity.** *Cancer Science*, **99**, 1471–1478.
- Hart, F., Danielczyk, A. & Goletz, S. (2017) **Human cell line-derived monoclonal IgA antibodies for cancer immunotherapy.** *Bioengineering*, **4**, 42.
- Heremans, J.F., Heremans, M.-T. & Schultz, H.E. (1959) **Isolation and description of a few properties of the  $\beta$ 2A-globulin of human serum.** *Clinica Chimica Acta*, **4**, 96–102.
- Hernandez-Ilizaliturri, F.J., Jupudy, V., Ostberg, J., Oflazoglu, E., Huberman, A., Repasky, E. & Czuczman, M.S. (2003) **Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a Non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model.** *Clinical Cancer Research*, **9**, 5866.
- Herr, A.B., White, C.L., Milburn, C., Wu, C. & Bjorkman, P.J. (2003) **Bivalent binding of IgA1 to Fc $\alpha$ R1 suggests a mechanism for cytokine activation of IgA phagocytosis.** *Journal of Molecular Biology*, **327**, 645–657.
- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T. & Naoe, T. (2009) **Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance.** *Blood*, **113**, 4885.
- Hoffmeister, K.M. & Falet, H. (2016) **Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance.** *Proceedings of the 8th Symposium on Hemostasis: Translational and Basic Science Discoveries*, **141**, S68–S72.
- Honeychurch, J., Alduaij, W., Azizyan, M., Cheadle, E.J., Pelicano, H., Ivanov, A., Huang, P., Cragg, M.S. & Illidge, T.M. (2012) **Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway.** *Blood*, **119**, 3523.
- Howard, G.C. and Kaser, M.R. (2013) **Making and Using Antibodies: A Practical Handbook**, CRC Press, Second Edition, S.86-87, ISBN-13: 978-1439869086, ISBN-10: 1439869081
- Hu, W., Ge, X., You, T., Xu, T., Zhang, J., Wu, G., Peng, Z., Chorev, M., Aktas, B.H., Halperin, J.A., Brown, J.R. & Qin, X. (2011) **Human CD59 inhibitor sensitizes rituximab resistant lymphoma cells to complement-mediated cytotoxicity.** *Cancer research*, **71**, 2298–2307.
- van Imhoff, G.W., McMillan, A., Matasar, M.J., Radford, J., Ardeschna, K.M., Kuliczowski, K., Kim, W., Hong, X., Goerleov, J.S., Davies, A., Barrigón, M.D.C., Ogura, M., Leppä, S., Fennessy, M., Liao, Q., van der Holt, B., Lisby, S. & Hagenbeek, A. (2016) **Ofatumumab versus rituximab salvage chemoimmunotherapy in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: The ORCHARRD Study.** *Journal of Clinical Oncology*, **35**, 544–551.
- Ivanov, A., Beers, S.A., Walshe, C.A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K.L., Potter, K.N., Murray, S., Chan, C.H.T., Klymenko, T., Erenpreisa, J., Glennie, M.J., Illidge, T.M. & Cragg, M.S. (2009) **Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells.** *The Journal of Clinical Investigation*, **119**, 2143–2159.
- Jadayel, D., Lukas, J., Nacheva, E., Bartkova, J., Stranks, G., De Schouwer, P., Lens, D., Bartek, J., Dyer, M., Kruger, A. & Catovsky, D. (1997) **Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519).** *Leukemia*, **11**, 64–72.
- Jaffers, G.J., Fuller, T.C., Cosimi, A.B., Russell, P.S., Winn, H.J. & Colvin, R.B. (1986) **Monoclonal antibody therapy. Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intense immunosuppression.** *Transplantation*, **41**(5), 572–578.
- Jak, M., van Bochove, G.G.W., Reits, E.A., Kallemeijn, W.W., Tromp, J.M., Umana, P., Klein, C., van Lier, R.A.W., van Oers, M.H.J. & Eldering, E. (2011) **CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101.** *Blood*, **118**, 5178.

- Jakobivits, A., Green, L.L., Hardy, M.C., Maynard-Currie, C.E., Tsuda, H., Louie, D.M., Mendez, M.J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D.H., Zeng, Y., David, N.E., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D.G., Hales, J.F., McGuinness, R.P., Capon, D.J. & Klapholz, S. (1995) **Production of antigen-specific human antibodies from mice engineered with human heavy and light chain YACs.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, **764**, 525–535.
- Jones, P., Dear, P., Foote, J., Neuberger, M. & Winter, G. (1986) **Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse.** *Nature*, **321**(6069), 522–525.
- Kansas, G.S. & Tedder, T.F. (1991) **Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway.** *The Journal of Immunology*, **147**, 4094.
- Kellner, C., Otte, A., Cappuzzello, E., Klausz, K. & Peipp, M. (2017) **Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **44**, 327–336.
- Kellner, C., Peipp, M. & Valerius, T. (2011) **Effector cell recruitment by bispecific antibodies.** *Bispecific antibodies*, Kontermann RE (ed) pp 217–241. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20910-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20910-9_13).
- Kelton, W., Mehta, N., Charab, W., Lee, J., Lee, C., Kojima, T., Kang, T.H. & Georgiou, G. (2014) **IgGA: A “cross-isotype” engineered human Fc antibody domain that displays both IgG-like and IgA-like effector functions.** *Chemistry & Biology*, **21**, 1603–1609.
- Kennedy, A.D., Beum, P.V., Solga, M.D., DiLillo, D.J., Lindorfer, M.A., Hess, C.E., Densmore, J.J., Williams, M.E. & Taylor, R.P. (2004) **Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia.** *The Journal of Immunology*, **172**, 3280.
- Kerr, M.A. (1990) **The structure and function of human IgA.** *Biochemical Journal*, **271**, 285–296.
- Klein, C., Lammens, A., Schäfer, W., Georges, G., Schwaiger, M., Mössner, E., Hopfner, K.-P., Umaña, P. & Niederfellner, G. (2013) **Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties.** *mAbs*, **5**, 22–33.
- Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J.S., Nadkarni, J.J., Wigzell, H. & Clifford, P. (1968) **Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell *in vivo* and in derived culture lines.** *Cancer Research*, **28**, 1300.
- Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J. & Mumford, D. (1975) **An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by *in vitro* infection.** *Intervirology*, **5**, 319–34.
- Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., E.G.Kr. von dem Borne, A. & de Haas, M. (1997) **FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype.** *Blood*, **90**, 1109.
- Kohler, G. & Milstein, C. (1975) **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature*, **256**, 495–497.
- Kretschmer, A., Schwanbeck, R., Valerius, T. & Rösner, T. (2017) **Antibody isotypes for tumor immunotherapy.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **44**, 320–326.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. (2013) **Immunogenic cell death in cancer therapy.** *Annual Review of Immunology*, **31**, 51–72.
- Kubonishi, I., Niiya, K. & Miyoshi, I. (1985) **Establishment of a new human lymphoma line that secretes plasminogen activator.** *Japanese Journal of Cancer Research GANN*, **76**, 12–15.
- Kyi, C. & Postow, M.A. (2016) **Immune checkpoint inhibitor combinations in solid tumors: opportunities and challenges.** *Immunotherapy*, **8**, 821–837.
- Lai, R., McDonnell, T., O'Connor, S., Medeiros, L., Oudat, R., Keating, M., Morgan, M., Curiel, T. & Ford, R. (2002) **Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino.** *Leukemia Research*, **26**, 849–855.

- Larkin J, Lao CD, Urba WJ & et al (2015) **Efficacy and safety of nivolumab in patients with braf v600 mutant and braf wild-type advanced melanoma: A pooled analysis of 4 clinical trials.** *JAMA Oncology*, **1**, 433–440.
- Leidi, M., Gotti, E., Bologna, L., Miranda, E., Rimoldi, M., Sica, A., Roncalli, M., Palumbo, G.A., Introna, M. & Golay, J. (2009) **M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than M1 cells *in vitro*.** *The Journal of Immunology*, **182**, 4415.
- Léveillé, C., Al-Daccak, R. & Mourad, V. (1999) **CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines.** *European Journal of Immunology*, **29**, 65–74.
- Li, H., Ayer, L.M., Polyak, M.J., Mutch, C.M., Petrie, R.J., Gauthier, L., Shariat, N., Hendzel, M.J., Shaw, A.R., Patel, K.D. & Deans, J.P. (2004) **The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism.** *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 19893–19901.
- Lim, S.H., Beers, S.A., French, R.R., Johnson, P.W.M., Glennie, M.J. & Cragg, M.S. (2010) **Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives.** *Haematologica*, **95**, 135.
- Lohse, S., Derer, S., Beyer, T., Klausz, K., Peipp, M., Leusen, J.H.W., van de Winkel, J.G.J., Dechant, M. & Valerius, T. (2011) **Recombinant dimeric IgA antibodies against the epidermal growth factor receptor mediate effective tumor cell killing.** *The Journal of Immunology*, **186**, 3770.
- Lohse, S., Loew, S., Kretschmer, A., Jansen, J.H.M., Meyer, S., ten Broeke, T., Rösner, T., Dechant, M., Derer, S., Klausz, K., Kellner, C., Schwanbeck, R., French, R.R., Tipton, T.R.W., Cragg, M.S., Schewe, D.M., Peipp, M., Leusen, J.H.W. & Valerius, T. (2017) **Effector mechanisms of IgA antibodies against CD20 include recruitment of myeloid cells for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity.** *British Journal of Haematology* Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.14624>.
- Lohse, S., Meyer, S., Meulenbroek, L.A.P.M., Jansen, J.H.M., Nederend, M., Kretschmer, A., Klausz, K., Möglinger, U., Derer, S., Rösner, T., Kellner, C., Schewe, D., Sondermann, P., Tiwari, S., Kolarich, D., Peipp, M., Leusen, J.H.W. & Valerius, T. (2016) **An anti-EGFR IgA that displays improved pharmacokinetics and myeloid effector cell engagement *in vivo*.** *Cancer Research*, **76**, 403.
- Lorin, V. & Mouquet, H. (2015) **Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies.** *Journal of Immunological Methods*, **422**, 102–110.
- Maliszewski, C.R., March, C.J., Schoenborn, M.A., Gimpel, S. & Shen, L. (1990) **Expression cloning of a human Fc receptor for IgA.** *The Journal of Experimental Medicine*, **172**, 1665.
- Maloney, D.G., Grillo-López, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.-M., Dallaire, B.K., Wey, K., Royston, I., Davis, T. & Levy, R. (1997) **IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma.** *Blood*, **90**, 2188.
- Mantis, N.J., Rol, N. & Corthésy, B. (2011) **Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut.** *Mucosal immunology*, **4**, 603–611.
- Marston, B., Palanichamy, A. & Anolik, J.H. (2010) **B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis.** *Current opinion in rheumatology*, **22**, 307–315.
- Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P. & Sharfstein, S.T. (2012) **Identifying bottlenecks in transient and stable production of recombinant monoclonal-antibody sequence variants in Chinese hamster ovary cells.** *Biotechnology Progress*, **28**, 846–855.
- Matsuda, M., Shikata, K., Wada, J., Sugimoto, H., Shikata, Y., Kawasaki, T. & Makino, H. (1998) **Deposition of mannan binding protein and mannan binding protein-mediated complement activation in the glomeruli of patients with IgA nephropathy.** *Nephron*, **80**(4), 408–13.
- Maugeri, N., Rovere-Querini, P., Evangelista, V., Covino, C., Capobianco, A., Bertilaccio, M.T.S., Piccoli, A., Totani, L., Cianflone, D., Maseri, A. & Manfredi, A.A. (2009) **Neutrophils phagocytose activated platelets *in vivo*: a phosphatidylserine, P-selectin, and  $\beta 2$  integrin-dependent cell clearance program.** *Blood*, **113**, 5254.

- Mazengera, R.L. & Kerr, M.A. (1990) **The specificity of the IgA receptor purified from human neutrophils.** *Biochemical Journal*, **272**, 159–165.
- McLaughlin, P., Grillo-López, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A.D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. & Dallaire, B.K. (1998) **Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program.** *Journal of Clinical Oncology*, **16**, 2825–2833.
- Meyer, S., Nederend, M., Jansen, J.M., Reiding, K.R., Jacobino, S.R., Meeldijk, J., Bovenschen, N., Wuhler, M., Valerius, T., Ubink, R., Boross, P., Rouwendal, G. & Leusen, J.H. (2016) **Improved *in vivo* anti-tumor effects of IgA-Her2 antibodies through half-life extension and serum exposure enhancement by FcRn targeting.** *mAbs*, **8**, 87–98.
- Miyazaki, R., Kuroda, M., Akiyama, T., Otani, I., Tofuku, Y. & Takeda, R. (1984) **Glomerular deposition and serum levels of complement control proteins in patients with IgA nephropathy.** *Clinical nephrology*, **21(6)**, 335–340.
- Monteiro, R.C. & van de Winkel, J.G.J. (2003) **IgA Fc Receptors.** *Annual Review of Immunology*, **21**, 177–204.
- Morell, A., Terry, W.D. & Waldmann, T.A. (1970) **Metabolic properties of IgG subclasses in man.** *Journal of Clinical Investigation*, **49**, 673–680.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A. & Oi, V.T. (1984) **Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 6851–6855.
- Morton, H.C., van den Herik-Oudijk, I.E., Vossebeld, P., Snijders, A., Verhoeven, A.J., Capel, P.J.A. & van de Winkel, J.G.J. (1995) **Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR  $\gamma$  chain: molecular basis for CD89/FcR $\gamma$  chain association.** *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 29781–29787.
- Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., Ferrara, C., Sondermann, P., Jäger, C., Strein, P., Fertig, G., Friess, T., Schüll, C., Bauer, S., Dal Porto, J., Del Nagro, C., et al (2010) **Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity.** *Blood*, **115**, 4393.
- Mostov, K.E. (1994) **Transepithelial transport of immunoglobulins.** *Annual Review of Immunology*, **12**, 63–84.
- Mostov, K.E., Friedlander, M. & Blobel, G. (1984) **The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains.** *Nature*, **308**, 37–43.
- Musil, L.S. & Baenziger, J.U. (1987) **Cleavage of membrane secretory component to soluble secretory component occurs on the cell surface of rat hepatocyte monolayers.** *The Journal of Cell Biology*, **104**, 1725–1733.
- National Cancer Institute at the Institutes of Health (2013) *FDA Approval for Obinutuzumab* Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-obinutuzumab> [Accessed November 7, 2017].
- Nelson, A.L. (2010) **Antibody fragments: Hope and hype.** *mAbs*, **2**, 77–83.
- Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Slootstra, J.W., Timmerman, P., Brännström, A., Lindstrom, F., Mössner, E., Umana, P., Hopfner, K.-P. & Klein, C. (2011) **Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies.** *Blood*, **118**, 358.
- NIH U.S. National Library of Medicine (2012) **Mannose-binding lectin deficiency.** Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/mannose-binding-lectin-deficiency> [Accessed November 7, 2017].
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. (2005) **Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding.** *Science*, **310**, 1510.



- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. (2008) **Fcγ receptors as regulators of immune responses.** *Nat Rev Immunol*, **8**, 34–47.
- van Oers, M.H.J. (2012) **CD20 antibodies: type II to tango?** *Blood*, **119**, 5061.
- Osterborg, A., Kipps, T.J., Mayer, J., Stilgenbauer, S., Williams, C.D., Hellmen, A., Robak, T., Furman, R.R., Hillmen, P., Trneny, M., Dyer, M.J.S., Padmanabhan, S., Kozak, T., Chan, G., Davis, R.L., Losic, N., Russell, C.A., Piotrowska, M., Wilms, J. & Wierda, W.G. (2015) **Ofatumumab (HuMax-CD20), a novel CD20 monoclonal antibody, is an active treatment for patients with CLL refractory to both fludarabine and alemtuzumab or bulky fludarabine-refractory disease: results from the planned interim analysis of an international pivotal trial.** *Blood*, **112**, 328.
- Owen, C.J. & Stewart, D.A. (2015) **Obinutuzumab for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: overview and perspective.** *Therapeutic Advances in Hematology*, **6**, 161–170.
- Pabst, O., Cerovic, V. & Hornef, M. (2016) **Secretory IgA in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota.** *Trends in Immunology*, **37**, 287–296.
- Pascal, V., Laffleur, B., Debin, A., Cuvillier, A., van Egmond, M., Drocourt, D., Imbertie, L., Pangault, C., Tarte, K., Tiraby, G. & Cogné, M. (2012) **Anti-CD20 IgA can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells.** *Haematologica*, **97**, 1686–1694.
- Pawluczkwycz, A.W., Beurskens, F.J., Beum, P.V., Lindorfer, M.A., van de Winkel, J.G.J., Parren, P.W.H.I. & Taylor, R.P. (2009) **Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX.** *The Journal of Immunology*, **183**, 749.
- Pedersen, A.E., Jungersen, M.B. & Pedersen, C.D. (2011) **Monocytes mediate shaving of B-cell-bound anti-CD20 antibodies.** *Immunology*, **133**, 239–245.
- Peeters, M., Balfour, J. & Arnold, D. (2008) **Review article: panitumumab - a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer.** *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **28**, 269–281.
- Petrie, R.J. & Deans, J.P. (2002) **Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts.** *The Journal of Immunology*, **169**, 2886.
- Polyak, M.J. & Deans, J.P. (2002) **Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure.** *Blood*, **99**, 3256.
- Polyak, M.J., Tailor, S.H. & Deans, J.P. (1998) **Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment.** *The Journal of Immunology*, **161**, 3242.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J. & Robinson, A. (1958) **Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.** *The Journal of Experimental Medicine*, **108**, 945–956.
- Reth, M. (1989) **Antigen receptor tail clue.** *Nature*, **338**, 383–384.
- Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L. & Chintalacharuvu, K.R. (2000) **The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes.** *The Journal of Experimental Medicine*, **191**, 2171.
- Romano, M.F., Lamberti, A., Tassone, P., Alfinito, F., Costantini, S., Chiurazzi, F., Defrance, T., Bonelli, P., Tuccillo, F., Turco, M.C. & Venuta, S. (1998) **Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells.** *Blood*, **92**, 990.
- Roopenian, D.C. & Akilesh, S. (2007) **FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age.** *Nat Rev Immunol*, **7**, 715–725.

- Roos, A., Bouwman, L.H., van Gijlswijk-Janssen, D.J., Faber-Krol, M.C., Stahl, G.L. & Daha, M.R. (2001) **Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway.** *The Journal of Immunology*, **167**, 2861.
- Roque-Barreira, M.C. & Campos-Neto, A. (1985) **Jacalin: an IgA-binding lectin.** *The Journal of Immunology*, **134**, 1740.
- Rouwendaal, G.J., van der Lee, M.M., Meyer, S., Reiding, K.R., Schouten, J., de Roo, G., Egging, D.F., Leusen, J.H., Boross, P., Wuhler, M., Verheijden, G.F., Dokter, W.H., Timmers, M. & Ubink, R. (2016) **A comparison of anti-HER2 IgA and IgG1 in vivo efficacy is facilitated by high N-glycan sialylation of the IgA.** *mAbs*, **8**, 74–86.
- Sakamoto, N., Shibuya, K., Shimizu, Y., Yotsumoto, K., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Nakauchi, H. & Shibuya, A. (2001) **A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues.** *Eur J Immunol.*, **31**(5), 1310–6.
- Schachter, J., Ribas, A., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.-J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C., Petrella, T.M., Hamid, O., Zhou, H., Ebbinghaus, S., Ibrahim, N. & Robert, C. (2017) **Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006).** *The Lancet* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067361731601X>.
- Schuh, E., Berer, K., Mulazzani, M., Feil, K., Meinl, I., Lahm, H., Krane, M., Lange, R., Pfannes, K., Subklewe, M., Gürkrov, R., Bradl, M., Hohlfeld, R., Kümpfel, T., Meinl, E. & Krumbholz, M. (2016) **Features of human CD3<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> T cells.** *The Journal of Immunology*, **197**, 1111.
- Sehn, L.H., Donaldson, J., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., Klasa, R., MacPherson, N., O'Reilly, S., Spinelli, J.J., Sutherland, J., Wilson, K.S., Gascoyne, R.D. & Connors, J.M. (2005) **Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia.** *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 5027–5033.
- Sgro, C. (1995) **Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review.** *Immunotoxicology Papers presented at the Third Summer School in Immunotoxicology*, **105**, 23–29.
- Shan, D., Ledbetter, J.A. & Press, O.W. (1998) **Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies.** *Blood*, **91**, 1644.
- Sharma, P. & Allison, J.P. (2015) **The future of immune checkpoint therapy.** *Science*, **348**, 56.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A. & Ribas, A. (2017) **Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy.** *Cell*, **168**, 707–723.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Endo, Y., Fujita, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Nakauchi, H. (2000) **Fcα/μ receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes.** *Nat Immunol*, **1**, 441–446.
- Siddiqui, M. & Scott, L. (2005) **Infliximab: a review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis.** *Drugs*, **65**(12), 2179–208.
- Smith, G. (1985) **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science*, **228**, 1315.
- Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., Faldella, A., Rege-Cambrin, G., Thunberg, U., Nilsson, K. & Caligaris-Cappio, F. (1999) **MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation.** *Leukemia Research*, **23**, 127–136.
- Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R. & Schlossman, S.F. (1980) **Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen.** *The Journal of Immunology*, **125**, 1678.
- Stockert, R.J., Kressner, M.S., Collins, J.C., Sternlieb, I. & Morell, A.G. (1982) **IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 6229–6231.

- Strohl, W.R. (2017) **Current progress in innovative engineered antibodies.** *Protein & Cell* Available at: <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0457-8>.
- Tedder, T.F. & Engel, P. (1994) **CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes.** *Immunology Today*, **15**, 450–454.
- Tedder, T.F., Forsgren, A., Boyd, A.W., Nadler, L.M. & Schlossman, S.F. (1986) **Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes.** *European Journal of Immunology*, **16**, 881–887.
- Tedder, T.F., Streuli, M., Schlossman, S.F. & Saito, H. (1988) **Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 208–212.
- Teeling, J.L., French, R.R., Cragg, M.S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P.W.H.I., Hack, C.E., Dechant, M., Valerius, T., van de Winkel, J.G.J. & Glennie, M.J. (2004) **Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas.** *Blood*, **104**, 1793.
- Teeling, J.L., Mackus, W.J.M., Wiegman, L.J.J.M., van den Brakel, J.H.N., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., Parren, P.W.H.I., Glennie, M.J. & van de Winkel, J.G.J. (2006) **The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20.** *The Journal of Immunology*, **177**, 362.
- The international immunogenetics information system® (1995) IMGT. Available at: <http://www.imgt.org/>.
- Tobinai, K., Klein, C., Oya, N. & Fingerle-Rowson, G. (2017) **A review of obinutuzumab (GA101), a novel type II anti-CD20 monoclonal antibody, for the treatment of patients with B-cell malignancies.** *Advances in Therapy*, **34**, 324–356.
- Tomasi, T.B., Tan, E.M., Solomon, A. & Prendergast, R.A. (1965) **Characteristics of an immune system common to certain external secretions.** *The Journal of Experimental Medicine*, **121**, 101.
- Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M. (2015) **Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy.** *Cancer cell*, **27**, 450–461.
- Turner, M.W. (1996) **Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system.** *Immunology Today*, **17**, 532–540.
- Tweeddale, M., Lim, B., Jamal, N., Robinson, J., Zalcborg, J., Lockwood, G., Minden, M. & Messner, H. (1987) **The presence of clonogenic cells in high-grade malignant lymphoma: a prognostic factor.** *Blood*, **69**, 1307.
- Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J.A., Ravetch, J.V., Poe, J.C., Haas, K.M. & Tedder, T.F. (2004) **The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor–dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy.** *The Journal of Experimental Medicine*, **199**, 1659.
- Umana, P., Brünkner, P., Ferrara Koller, C., Suter, T., Püntener, U. & Mössner, E. (2011) **CD20 antibodies with increased Fc receptor binding affinity and effector function.** Patent
- Umana, P., Moessner, E., Bruenker, P., Unsin, G., Puentener, U., Suter, T., Grau, R., Schmidt, C., Gerdes, C., Nopora, A., Patre, M., Moser, S., Sondermann, P., Wheat, L., Dyer, M.J.S., Poppema, S., Bauer, S., Strein, P., Friess, T. & Klein, C. (2015) **Novel 3<sup>rd</sup> generation humanized type II CD20 antibody with glycoengineered Fc and modified elbow hinge for enhanced ADCC and superior apoptosis induction.** *Blood*, **108**, 229.
- U.S. Food and Drug Administration (2016) **Obinutuzumab.** Available at: <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm488013.htm> [Accessed November 7, 2017].
- Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriel, A.B., Graziano, R.F., van den Herik-Oudijk, I.E., Repp, R., Deo, Y.M., Lund, J., Kalden, J.R., Gramatzki, M. & G.J. van de Winkel, J. (1997) **FcαRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy.** *Blood*, **90**, 4485.
- Valgardsdottir, R., Cattaneo, I., Klein, C., Introna, M., Figliuzzi, M. & Golay, J. (2017) **Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B cells opsonized with anti-CD20 antibodies.** *Blood*, **129**, 2636.

- Van Der Kolk, L.E., Grillo-López, A.J., Baars, J.W., Hack, C.E. & Van Oers, M.H.J. (2001) **Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment.** *British Journal of Haematology*, **115**, 807–811.
- Verhoven, B., Schlegel, R.A. & Williamson, P. (1995) **Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes.** *The Journal of Experimental Medicine*, **182**, 1597–1601.
- Wang, S.-Y., Racila, E., Taylor, R.P. & Weiner, G.J. (2008) **NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement.** *Blood*, **111**, 1456.
- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S. & Sondel, P.M. (2015) **NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy.** *Frontiers in Immunology*, **6**, 368.
- Warmerdam, P.A., van de Winkel, J.G., Gosselin, E.J. & Capel, P.J. (1990) **Molecular basis for a polymorphism of human Fc  $\gamma$  receptor II (CD32).** *The Journal of Experimental Medicine*, **172**, 19.
- Wekerle, H. (2017) **B cells in multiple sclerosis.** *Autoimmunity*, **50**, 57–60.
- Weng, W.-K. & Levy, R. (2003) **Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma.** *Journal of Clinical Oncology*, **21**, 3940–3947.
- Wirt, T., Roskopf, S., Rösner, T., Eichholz, K.M., Kahrs, A., Lutz, S., Kretschmer, A., Valerius, T., Klausz, K., Otte, A., Gramatzki, M., Peipp, M. & Kellner, C. (2017) **An Fc double-engineered CD20 antibody with enhanced ability to trigger complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **44**, 292–300.
- Woof, J.M. & Kerr, M.A. (2006) **The function of immunoglobulin A in immunity.** *The Journal of Pathology*, **208**, 270–282.

## 9. Anhang

### 9.1 Material

#### 9.1.1 Laborgeräte

Tabelle 19: Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller/Distributor
<b>1450 MicroBeta®TriLux LSC &amp; Luminiscence Counter</b>	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
<b>320 XB Basic Analytical and Precision Balances (Modell XB2200C)</b>	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
<b>AEG Santo Öko (Kühl- und Gefrierkombination)</b>	AEG, Berlin, D
<b>ÄKTA purifier 10</b>	GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK
<b>Axiovert 40C</b>	Zeiss, Oberkochen, D
<b>Axiocam ERC5s</b>	Zeiss, Oberkochen, D
<b>Axiostar Plus</b>	Zeiss, Oberkochen, D
<b>COULTER® EPICS® XL™ &amp; NAVIOS™ Flow Cytometer</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
<b>Cytoperm™ 2 CO<sub>2</sub>-Inkubator, Heraeus</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>E.A.S.Y® Doc plus</b>	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, D
<b>Experion™ Automated Electrophoresis System</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Gel Doc™ XR+ System</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Heracell®240 &amp; Heracell®150 (Brutschrank)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Heraeus™ Biofuge Pico™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Heraeus® Function Line B12</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Heraeus® Megafuge® 1.0 R</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Heraeus™ Multifuge™ 3S+</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

	USA
<b>HERAfreeze™ (Ultratiefkühlschrank)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Herasafe™ (HS oder KS; Sicherheitswerkbank)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>HI-2215 Logging pH &amp; mV Bench Meter</b>	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
<b>IKA Magnetrührer RCT basic safety control</b>	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
<b>IKA Magnetrührer RH basic 2</b>	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
<b>Inkubations- / Inaktivierungsbad Modell 1002</b>	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
<b>Kirsch Froster-520 (Laborgefrierschrank)</b>	Phillip Kirsch GmbH, Offenburg, D
<b>LB 124 SCINT contamination monitor for <math>\alpha</math>- and <math>\beta</math>-<math>\gamma</math>-Measurement</b>	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH und Co. KG, Bad Wildbad, D
<b>Liebherr profi line (4°C) &amp; comfort (-20°C) (Kühl- und Gefrierschränke)</b>	Liebherr-International AG, Bulle, CH
<b>Mikrowelle 7020 G</b>	Continent,
<b>Milli-Q® Synthesis A10®</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>Mini-Sub® Cell GT Cell</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Minitron (Inkubationsschüttler)</b>	Infors AG, Bottmingen, CH
<b>MR Hei-Mix S (Magnetrührer)</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
<b>PowerPac™ HC Power Supply</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Revco™ Hochleistungschromatographie-Kühlgeräte (Modell REC5004V20)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Sartorius CP153-OCE (Waage)</b>	Sartorius AG, Göttingen, D
<b>Scotsman Eiswürfelbereiter AF206</b>	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
<b>Stuart™ Block Heater SBH130D</b>	Stuart Equipment, Cole-Parmer, Staffordshire, UK
<b>Stuart™ Gyratory rocker, SSL3</b>	Stuart Equipment, Cole-Parmer, Staffordshire, UK
<b>Sunrise™ Plate-Reader</b>	Tecan Group Ltd., Männerdorf, CH
<b>Superdex200 10x30mm</b>	GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK
<b>Syngene GelVue (Modell GVS20) UV</b>	Syngene, A Division of Synoptics Ltd,

<b>Transilluminator</b>	Cambridge, UK
<b>Systec 5075 EL (Autoklav)</b>	Systec GmbH, Linden, D
<b>Titramax 101 (Plattformschüttler, kreisförmig vibrierend)</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
<b>TRANS-BLOT® SD Semi-Dry Transferzelle</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>UVT-28 ME (UV-, LED-Blau- und LED-Weißlicht – Transilluminator)</b>	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, D
<b>VWR® Digital heatblock</b>	VWR International, Radnor, PA, USA
<b>Wasserbad</b>	Memmert, Schwabach, D
<b>Wide Mini-Sub® Cell GT Cell</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA

### 9.1.2 Verbrauchsmaterialien (Glas und Plastik)

Tabelle 20: Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Distributor
<b>Aspirations-Pipette 2ml</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>BEESANA® Mullkompressen 5 x 5 cm unsteril 8-fach</b>	Meditrade GmbH, Kiefersfelden, D
<b>3M™ Durapore™, 2,5cm x 9,1m, surgical tape</b>	3M Company, Maplewood, MN, USA
<b>Acrodisc® Spritzenvorsatzfilter mit Supor® Membran, Ø 13mm, Porengröße 0,22µm</b>	Pall Corporation, Port Washington, NY, USA
<b>Amersham Hybond-P, PVDF Membrane optimized for protein transfer</b>	GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK
<b>BD Plastipak™ kleinvolumige Spritzen (1mL)</b>	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>BD DISCARDIT™ II Spritze (10mL, 20mL)</b>	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>BioPhotometer Eppendorf</b>	Eppendorf AG, Hamburg, D
<b>Biosphere® Filter Tip (1250 µL lang, 200µL farblos, 100µL, 20µL farblos)</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>DURAN® Erlenmeyerkolben, enghalsig (500mL und 1000mL)</b>	DURAN Group GmbH, Wertheim, D
<b>DURAN® GL45 Flaschensortiment (250mL, 500mL, 1000mL und 2000mL)</b>	DURAN Group GmbH, Wertheim, D
<b>Eppendorf Combitips advanced® 2,5mL</b>	Eppendorf AG, Hamburg, D

<b>Experion Pro260 Analysis Kit</b>	Experion Pro260 Analysis Kit
<b>FEATHER disposable scalpel #10,</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Flexible-96, Clear 96-well Flexible PET Microplate, round bottom</b>	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
<b>Handschuhe Peha-soft® powderfree</b>	Paul Hartmann AG, Heidenheim a. d. Brenz, D
<b>Handschuhe MICRO-TOUCH® Nitra-Tex®</b>	Ansell Limited, Melbourne, AU
<b>IVAC®-50-ml-Spritze</b>	Alaris Medical Systems, San Diego, CA, USA
<b>Mikro-Schraubröhre, 1,5 mL und 2mL , PP</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Mikrotestplatte, 96 well, K</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Mikrotestplatte, 96 well, R</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Nunc-Immuno™ Module (ELISA-Streifen)</b>	Nalge Nunc International; Rochester, NY, USA
<b>Nunc® CryoTubes® cryogenic vial, 1.8 mL, internal thread, round bottom</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Octeniderm farblos Hautdesinfektion Pumpflasche 250 mL</b>	Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt, D
<b>PARAFILM® M (Verschlussfolie)</b>	Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA
<b>Plattierungsspatel</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Reagenzreservoirs (PVC, 100/Packung)</b>	VWR International, Radnor, PA, USA
<b>Roehrchengestelle, PP, 18 x 15 ml / 10 x 50 ml</b>	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
<b>Rotilabo®-Spritzenfilter, Ø 33 mm, PES steril, Porengröße 0,22µm</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Pipette tips (20µL, 100µL, 200µL stack pack)</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Poly-Prep® Chromatography Columns</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Röhre 5mL, 75x12mm, PP (FACS-Röhre)</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Röhre 15ml, 120x17mm, PP, mit Schraubdeckel</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Röhre 50ml, 114x28mm, PP, mit Schraubdeckel</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 mL, PP</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Safety-Multifly®-Kanüle</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>UV-transparente Einmal-Küvetten (für den Einsatz ab 220nm, 12,5 x 12,5 x 45mm)</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Serologische Pipette (1mL, 5mL, 10mL, 25mL und 50mL)</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D



<b>S-Monovette® (7,5mL Z/ 2,5mL Hirudin/8,2mL 9NC)</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>Stericup® and Steritop™ Vacuum Driven Sterile Filters</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>TC-Flasche (T25, T75 und T175 Standard)</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>TC-Platte 6 well, 24 well, 96 well, Suspension, F</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>TC-Platte 6 well, 24 well, 96 well, Standard, F</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>TC-Schale 100, Standard</b>	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
<b>TopSeal-A PLUS</b>	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
<b>Vivaspin® 6, 10.000 MWCO PES</b>	Sartorius AG, Göttingen, D
<b>Zählkammer, Neubauer-improved, Kammertiefe 0,1 mm</b>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
<b>ZelluTrans/Roth Dialysiermembranen, MWCO 3500, Flachbreite 19mm, Länge 15m</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

### 9.1.3 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 21: Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Distributor</b>
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
<b>2-Propanol</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>2xYT-Agar</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>2xYT-Medium</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b><sup>51</sup>Natriumchromat (5mCi/mL)</b>	HARTMANN ANALYTIC GmbH, Braunschweig, D
<b>Albumin Fraktion V, (BSA) proteasefrei</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Ampicillin Natriumsalz</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>BstEII-HF</b>	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<b>CutSmart® Buffer</b>	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<b>Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7%</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
<b>DBPS (1x und 10x), Gibco™</b>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<b>EDTA, Disodium Salt, Dihydrate</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>Ethanol, vergällt, ca. 80%, Chemsolute®</b>	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, D
<b>Ethidiumbromid, ≥98 %</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Glycerol</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

<b>Glycine (GR for analysis)</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>Hefeextrakt</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>HindIII-HF</b>	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<b>Latrunculin B</b>	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
<b>LB-Medium (Luria/Miller)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Methanol</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>Milchpulver (Blotting-Grade, pulv., fettarm)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Mineralöl</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
<b>Natriumazid</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>NotI-HF</b>	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<b>Roti®-Load DNA (mit Glycerin) 6x Gelladepuffer für die DNA-Elektrophorese</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Salzsäure 25 % (HCl)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>SDS Pellets</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>SeaKem® GTG™ Agarose</b>	Lonza Group AG, Basel, CH
<b>SeaKem LE Agarose</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
<b>TRIS PUFFERAN® ≥99,9 %, p.a.</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Triton® X-100</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>T4 DNA Ligase (1 U/μL)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>T4 DNA Ligase Buffer (10X)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Trypan Blue solution, 0.4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
<b>Tween® 20</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<b>UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Gibco™</b>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<b>Z-VAD-FMK</b>	ApexBio Technology, Houston, TX, USA

#### 9.1.4 Reagenzien & Kits

Tabelle 22: Alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Distributor</b>
<b>Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>CaptureSelect™ IgA-CH1 (Hu) Affinity Matrix</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

	USA
<b>CaptureSelect™ LC-kappa (Hu) Affinity Matrix</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Distilled Water, Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Dulbecco's Balanced Salt Solution (1xDPBS), no MgCl<sub>2</sub>, no CaCl<sub>2</sub> (Cat.No.: 14190094), Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Dulbecco's Balanced Salt Solution (10xDPBS), no MgCl<sub>2</sub>, no CaCl<sub>2</sub> (Cat.No.: 14200059), Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (DMEM), Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, pyruvate, no glutamine, Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>EndoFree Plasmid Maxi Kit (10)</b>	QIAGEN N.V., Venlo, NL
<b>Fetal Bovine Serum (Fötales Kälberserum, FKS) Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD</b>	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>Flow-Check™ Fluorospheres (fluorescent emission range of 525 nm to 700 nm when excited at 488 nm, Item No: 7547053)</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
<b>Dialyzed Fetal Bovine Serum (dialysiertes fötales Kälberserum, FKS) Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Gel Filtration Calibration Kit (HMW+LMW)</b>	GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK
<b>GS Gene Expression System™</b>	Lonza Group AG, Basel, CH
<b>Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>L-Methionine sulfoximine (MSX)</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
<b>Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>MEM Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA) (100X)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit</b>	Lonza Group AG, Basel, CH

<b>NucleoSpin® Plasmid (Plasmidisolations- Miniprep-Kit)</b>	MACHEREY-NAGEL GmbH und Co. KG, Düren, D
<b>Opti-MEM® I Reduced Serum Medium Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>Plasmocin™ - Mycoplasma Elimination Reagent</b>	InvivoGen, San Diego, CA, USA
<b>Polymorphprep™</b>	AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, NO
<b>Precision Plus Protein™ Dual Color Standard</b>	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Sigma Fast OPD™, MSX</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
<b>SimplyBlue Safe Stain Kit</b>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<b>SmartLadder (200 to 10000 bp)</b>	Eurogentec, Seraing, Liège, BE
<b>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Kit</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>QIAquick Gel Extraction Kit (250)</b>	QIAGEN N.V., Venlo, NL
<b>RPMI Media 1640 Gibco™</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>VersaLyse™ Lysing Solution</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

### 9.1.5 Vektoren

Tabelle 23: Alle In der Arbeit verwendeten DNA-Plasmide

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Distributor</b>
<b>pEX-A2-RTX-VH</b>	Eurofins Scientific SE, Luxemburg, LU
<b>pEX-A2-RTX-VL</b>	Eurofins Scientific SE, Luxemburg, LU
<b>pEX-A2-2F2-VH</b>	Eurofins Scientific SE, Luxemburg, LU
<b>pEX-A2-2F2-VL</b>	Eurofins Scientific SE, Luxemburg, LU
<b>pEX-A2-GA101-VH</b>	Eurofins Scientific SE, Luxemburg, LU
<b>pEX-A2-GA101-VL</b>	Eurofins Scientific SE, Luxemburg, LU
<b>maxGFP™</b>	Lonza Group AG, Basel, CH
<b>pEE14.4</b>	Lonza Group AG, Basel, CH

### 9.1.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tabelle 24: Allgemeine Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller/Distributor
<b>Affinitätschromatographie Elutionspuffer</b>	0,1 M Glycin, pH 3
<b>Affinitätschromatographie Neutralisationspuffer</b>	1 M Tris, pH 8,9
<b>ELISA-Stopplösung</b>	3M HCL (38,9mL 25% HCl + 61,1mL MiliQ H <sub>2</sub> O)
<b>Anderson Puffer</b>	6g Tris + 28,8 g Glycin, 10mL 10% SDS-Lösung + 200mL Methanol, auffüllen auf 1L mit dest. Wasser
<b>ELISA-Blocking-Puffer</b>	1x PBS + 0,1% w/v BSA + 0,05% v/v
<b>ELISA-Waschpuffer</b>	1x PBS + 0,05 % v/v Tween20
<b>Optiphas HiSafe 3</b>	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
<b>FACS-Puffer</b>	1x DPBS + 1% w/v BSA + 0,1% v/v Natriumazid
<b>5xLaemmli Puffer</b>	1650µL Tris (pH Wert 6,8) + 3438µL 10%SDS + 2500µL Glycerol + 0,62mg Bromphenolblau
<b>0,1% SDS-Gellaufpuffer</b>	25mM Tris + 192mM Glycin + 0,1 % w/v SDS, pH 8,3
<b>Western Blot Puffer 1</b>	2,42g Tris + 29,2g NaCl, pH 7,5 + 0,05% Tween20
<b>Western Blot Puffer 2</b>	2,42g Tris + 29,2g NaCl, pH 7,5 + 0,4% Tween20
<b>1xTBS</b>	1,2g Tris + 8,76g NaCl, pH 7,5

### 9.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 25: Alle in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller/Distributor
<b>One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i></b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<b>One Shot® Mach1™-T1R Chemically Competent <i>E. coli</i></b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

## 9.1.8 Antikörper

Tabelle 26: Auflistung aller in der Arbeit verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Cat.No./Ref	Klon	Verdünnung
<b>Anti-Human IgA (<math>\alpha</math>-chain specific)–Peroxidase antibody produced in goat</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	A0295 SIGMA		1:10000
<b>CD3-Krome Orange (IgG1-mouse)</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	B00068	UCHT1	10 $\mu$ L/test
<b>CD19-FITC (IgG1 kappa-mouse)</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	A07768	J3-119	20 $\mu$ L/test
<b>CD20-FITC (IgG2a -mouse)</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	A07772		10 $\mu$ L/test
<b>CD45-APC (IgG1 -mouse)</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	IM2473	J33	10 $\mu$ L/test
<b>Goat Anti-Human Kappa-FITC</b>	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA	2060-02	-	1:100 FACS 1:1000 ELISA
<b>Goat anti HU Kappa Chain:HRP</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, D	BZL 07045		1:2000
<b>IgG1-APC (IgG1-mouse)</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	IM2475	679.1Mc7	10 $\mu$ L/test
<b>IgG1(mouse)-FITC</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	A07795	679.1Mc7	20 $\mu$ L/test
<b>IgG1(mouse)-Krome Orange</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	A96145	679.1Mc7	10 $\mu$ L/test
<b>Intratect®(Infusionslösung, 50mg/mL)</b>	Biotest AG, Dreieich, D			
<b>Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/FITC Rabbit F(ab')<sub>2</sub> (0,2g/L)</b>	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK	F0057		1:200
<b>Polyclonal Rabbit Anti-Human C1q Complement/FITC</b>	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK			1:50

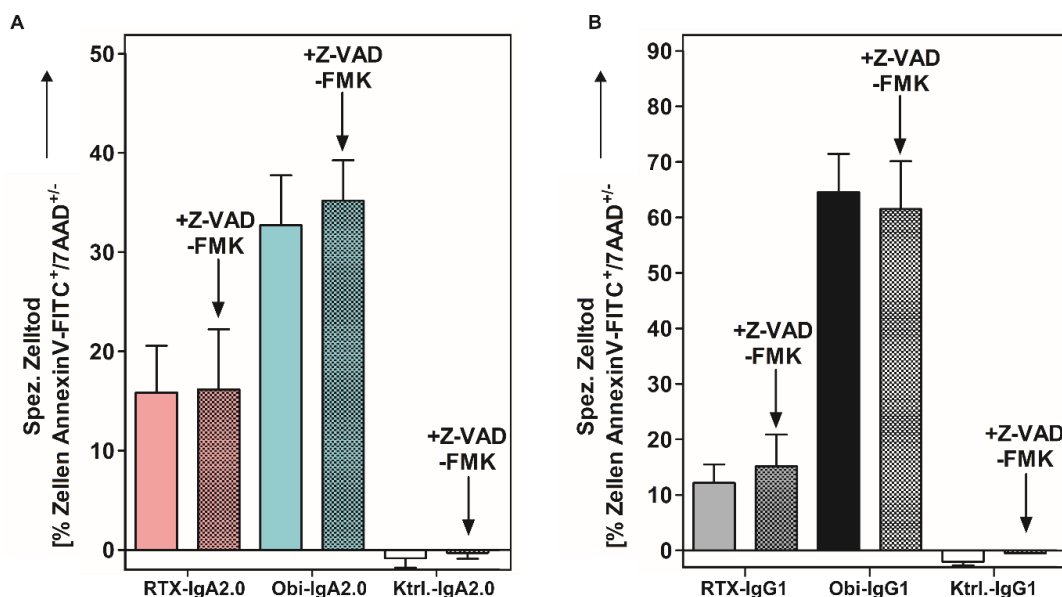
<b>Polyclonal Rabbit Anti-Human C4b Complement/FITC</b>	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK	1:50
<b>Soliris® (Eculizumab, 50mg/mL)</b>	Alexion Pharmaceuticals AG, New Haven, CT, USA	- - -

### 9.1.9 Software

Tabelle 27: Software die in dieser Arbeit verwendet wurde

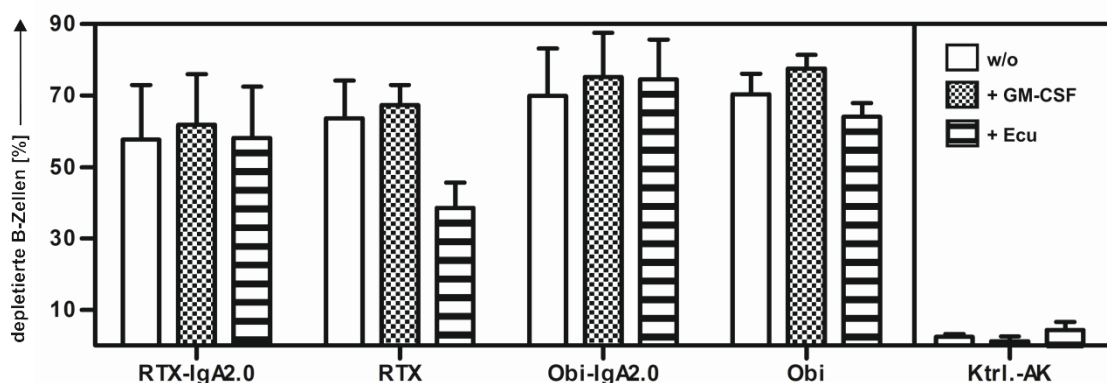
Bezeichnung	Hersteller/Distributor
<b>1450 MicroBeta Workstation Software</b>	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
<b>CorelDRAW® Graphics Suite X5,X8,X9</b>	Corel Corporation, Ottawa, CA
<b>Experion Software</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
<b>GraphPad Prism 4</b>	GraphPad Software, Inc., CA, USA
<b>Kaluza Analysis-Software</b>	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
<b>Microsoft Office 2016</b>	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<b>Unicorn 5.01 Software</b>	GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, UK)
<b>Vector NTI</b>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<b>Zotero</b>	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University, Fairfax, VA, USA

## 9.2 Inhibition der homotypischen Aggregation mit einem Pan-Caspase-Inhibitor



**Abbildung 54:** Durchflusszytometrische Bestimmung des spezifischen Zelltodes nach Antikörper-vermittelter Induktion der homotypischen Aggregation in SU-DHL4 Zellen nach der Inkubation mit Z-VAD-FMK. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,7 \times 10^6$  ausgesät und anschließend mit 50  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK oder einer DMSO-Kontrolle für 1 Stunde vorinkubiert. Alle CD20-gerichteten Antikörper oder Kontrollantikörper wurden im Anschluß in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/mL}$  eingesetzt. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit wurden die behandelten Zellen geerntet und mit einem Annexin V-FITC/7-AAD Kit gefärbt. Aufgetragen ist der durch die Antikörper induzierte spezifische Zelltod der Zielzellen als [% Zellen AnnexinV-FITC<sup>pos</sup>/7-AAD<sup>pos/neg</sup>]. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente.

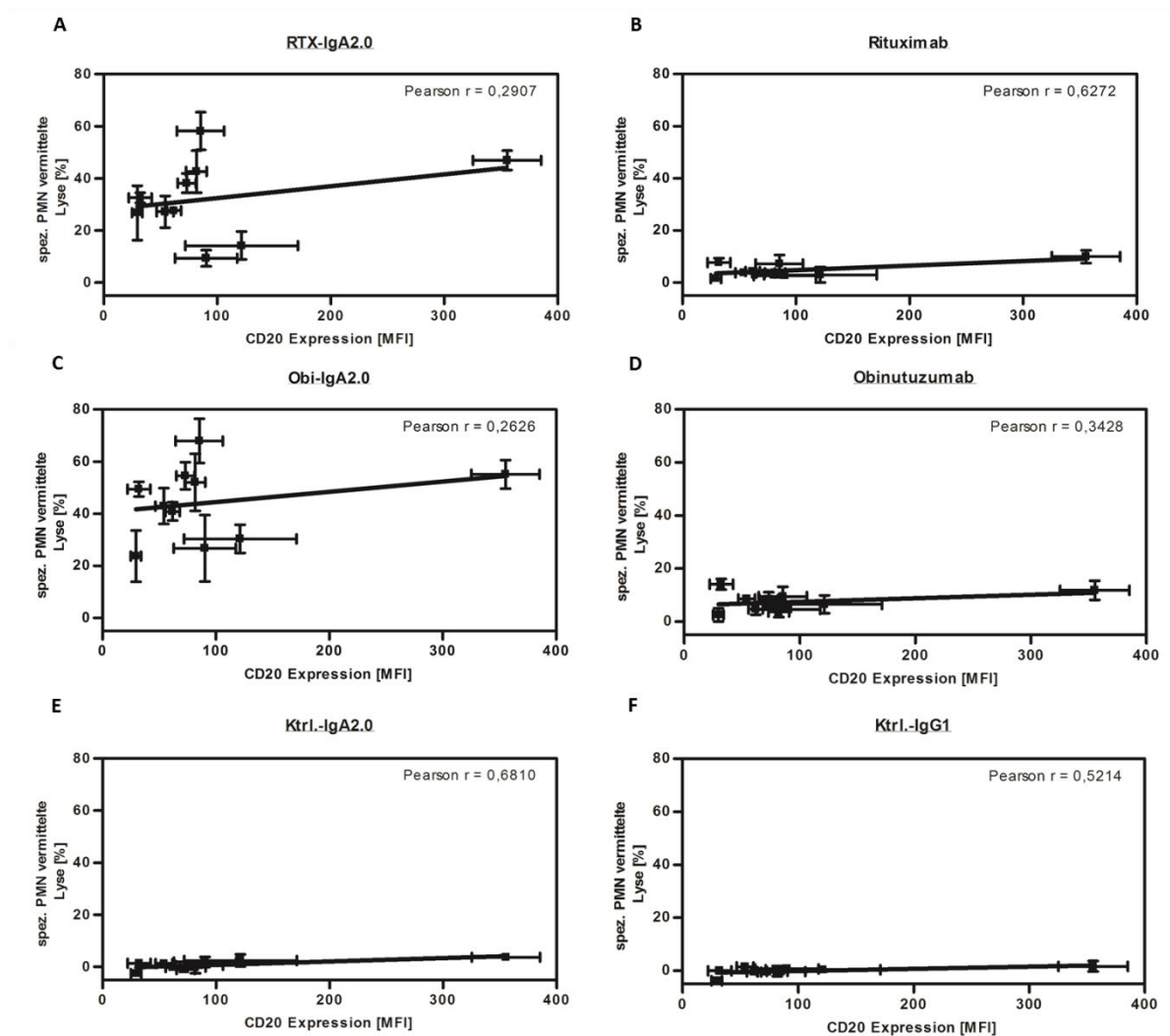
## 9.3 Beeinflussung der B-Zelldepletion durch den Einsatz von GM-CSF and Eculizumab



**Abbildung 55:** Durch CD20-gerichtete IgA2.0 und -IgG1 Antikörper induzierte Depletion von B-Zellen aus mit GM-CSF oder Eculizumab behandeltem humanen Vollblut. Vollblut gesunder Spender wurde mit GM-CSF und Eculizumab (200  $\mu\text{g/mL}$ ) versehen und anschließend mit 50  $\mu\text{g/mL}$  der jeweiligen CD20 oder Ktrl. IgA/IgG1 Antikörpern für 24 h inkubiert. Die Depletion der B-Zellen wurde durchflusszytometrisch unter der Nutzung von verschiedenen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern untersucht (spezifisch für CD45, CD19, und CD3). Dargestellt ist der durch die CD20-Antikörper induzierte prozentuale Anteil depletierter B-Zellen. Alle spez. CD20-Antikörper depletierten statistisch signifikant B-Zellen im Vergleich Vergleich zu einem Kontrollantikörper. GM-CSF konnte den prozentualen Anteil depletierter B-Zellen nicht statistisch signifikant steigern. Die durch RTX-induzierte prozentuale B-Zelldepletion konnte durch Eculizumab nicht statistisch signifikant inhibiert werden. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. Statistik: Two-Way-ANOVA mit Bonferroni-post-Test.



#### 9.4 Korrelation der CD20 Expression und PMN vermittelter ADCC verschiedener CD20<sup>pos</sup> Zelllinien



**Abbildung 56: Korrelation von CD20 Expression und IgA vermittelter ADCC mit PMN Effektorzellen.** Die CD20 Expression der verschiedenen Zelllinien wurde durchflusszytometrisch mit einem direkt gekoppelter CD20-FITC analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität mit Standardfehlern dreier unabhängiger Experimente. ADCC-Versuche wurden mit präparierten PMNs gesunder Spender in <sup>51</sup>Chromfreisetzungsvorsuchen durchgeführt. E:T Verhältnis 80:1. Konzentration der spez. - und Kontrollantikörper = 50 µg/mL. Spezifische PMN vermittelte Lyse [%] der untersuchten Zelllinien ist in Abhängigkeit ihrer CD20 Expression dargestellt. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient nach Pearson. Datenauswertung GraphPad Prism 4.

**10. Abkürzungsverzeichnis**

7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	Ampere
aa	<i>amino acid</i> , Aminosäuren
AAR	<u>anti-antibody-responses</u> , Anti-Antikörper Immunantworten
Abb	Abbildung
ABD	<u>albumin</u> bindende <u>Domäne</u>
ADCC	<u>antibody-dependent cellular cytotoxicity</u> , antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
ASGPR	<u>Asialoglykoprotein</u> rezeptor
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>B-cell receptor</i> , B-Zellrezeptor
BHK	Baby Hamster Kidney
BSA	Bovines Serumalbumin
Bspw.	beispielsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<u>complement dependent cytotoxicity</u> , komplementvermittelte Zytotoxizität
CDR	<u>Complementarity-determining region</u> , komplementartitätsbestimmende Region
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, und Prednison
CH	<u>Chain Heavy</u>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
cpm	<i>counts per minute</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DC	<u>dendritic cell</u> , dendritische Zelle
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> , diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	<i><u>E</u>xa<u>C</u>ellular region</i>
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EGFR	<i><u>e</u>pidermal <u>g</u>rowth <u>f</u>actor <u>r</u>eceptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>Sandwich Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i><u>E</u>uropean <u>M</u>edicines <u>A</u>gency</i> , Europäische Arzneimittel-Agentur
E:T-Verhältnis	Effektor-zu-Tumorzell-Verhältnis
Fab	<i><u>F</u>ragment <u>a</u>ntigen <u>b</u>inding</i> , antigenbindendes Fragment
FACS	<i><u>f</u>luorescence <u>a</u>ctivated <u>c</u>ell <u>s</u>orting</i>
Fc	<i><u>F</u>ragment <u>c</u>rystallizable</i> , kristallisierbares Fragment, Fc-Teil
FcR	Fc-Rezeptor
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FCS	<i><u>f</u>etal <u>c</u>alf <u>s</u>erum</i>
FDA	<i><u>F</u>ood and <u>D</u>rug <u>A</u>dmistration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Follikuläres Lymphom
FSC	<i><u>F</u>ree <u>S</u>ecretory <u>C</u>omponent</i>
g	Gramm
GAC	Größenausschlusschromatographie
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i><u>g</u>ranulocyte <u>m</u>acrophage <u>c</u>olony-<u>s</u>timulating <u>f</u>actor</i> , Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GS	Glutamin Synthetase
HA	homotypische Aggregation
HEK	<i><u>h</u>uman <u>e</u>mbryonic <u>k</u>idney</i>
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, <i><u>h</u>uman <u>e</u>pidermal <u>g</u>rowth <u>f</u>actor <u>r</u>eceptor 2</i>
HMGB1	<i><u>H</u>igh <u>m</u>obility <u>g</u>roup <u>b</u>ox 1</i>

HRP	<i>Horseradish-peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockproteine
Hu	human
ITAM	<i><u>immunoreceptor tyrosine-based activation-Motiv</u></i>
<i>i.v.</i>	<i>intra vena</i>
J chain	<i><u>Joining-chain</u></i>
κ	kappa
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
KIR	<i>killer cell inhibitory receptors</i>
<i>k.o.</i>	<i>knock out</i>
LatB	Latrunculin B
LIR/LILR/ILT	<i>leukocyte Ig-like receptors</i>
MAC	<i><u>m</u>embrane <u>a</u>ttack <u>c</u>omplex, Membranangriffskomplex</i>
max	maximal
MBL	mannosebindenes Lektin
MCL	<i><u>m</u>antle cell <u>l</u>ymphma, Mantelzelllymphom</i>
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MNC	<i><u>m</u>ononuclear cell = <u>p</u>eripheral blood mononuclear cell, PBMC</i>
mV	Millivolt
MWCO	<i><u>m</u>olecular weight cut off</i>
neg	negativ
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Obi	Obinutuzumab
Obi-IgA2.0	Obinutuzumab-IgA2.0
Ofa	Ofatumumab (IgG1)
Ofa-IgA2.0	Ofatumumab-IgA2.0
ORR	<i>Overall-Response-Rate</i>
OS	<i><u>O</u>verall <u>S</u>urvival</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCD	<i><u>P</u>rogrammed <u>c</u>ell <u>d</u>eath, programmierter Zelltod</i>
PFS	<i><u>P</u>rogression-<u>F</u>ree <u>S</u>urvival</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
pIgR	<i><u>P</u>olymeric <u>I</u>mmunoglobulin <u>R</u>ezeptor</i>
PMN	polymorphnukleäre Zellen
pos	positiv
POX	Peroxidase
R-CHOP	Rituximab + Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, und Prednison
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäuren
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTX	Rituximab (IgG1)
RTX-IgA2.0	Rituximab-IgA2.0
SC	<i><u>S</u>ecretory <u>C</u>omponent</i>
scFv	<i><u>s</u>ingle <u>c</u>hain <u>v</u>ariable <u>f</u>ragment</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
S-IgA	Sekretorisches IgA
Szi	Szinitiation
UV	Ultraviolett

VH	variable Region der schweren Kette
VL	variable Region der leichten Kette
w/o	without
Z-VAD-FMK	Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-Methyl]- Fluoromethylketon

## 11. Publikationen

**Antibody isotypes for tumor immunotherapy.** Kretschmer A\*, Schwanbeck R, Valerius T, Rösner T., Transfus Med Hemother. 2017 Sep;44(5):320-326. doi: 10.1159/000479240. Epub 2017 Sep 7. Review. PMID: 29070977

**An Fc double-engineered CD20 antibody with enhanced ability to trigger complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.** Wirt T, Roskopf S, Rösner T, Eichholz KM, Kahrs A, Lutz S, Kretschmer A, Valerius T, Klausz K, Otte A, Gramatzki M, Peipp M, Kellner C., Transfus Med Hemother. 2017 Sep;44(5):292-300. doi: 10.1159/000479978. Epub 2017 Sep 11. PMID: 29070974

**Effector mechanisms of IgA antibodies against CD20 include recruitment of myeloid cells for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity.** Lohse S\*, Loew S\*, Kretschmer A\*, Jansen JHM, Meyer S, Ten Broeke T, Rösner T, Dechant M, Derer S, Klausz K, Kellner C, Schwanbeck R, French RR, Tipton TRW, Cragg MS, Schewe DM, Peipp M, Leusen JHW, Valerius T., Br J Haematol. 2017 Apr 27. doi: 10.1111/bjh.14624. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 28449349

**Monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor acquire an ability to kill tumor cells through complement activation by mutations that selectively facilitate the hexamerization of IgG on opsonized cells.** Tammen A\*, Derer S, Schwanbeck R, Rösner T, Kretschmer A, Beurskens FJ, Schuurman J, Parren PW, Valerius T., J Immunol. 2017 Feb 15;198(4):1585-1594. doi: 10.4049/jimmunol.1601268. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28062698

**An anti-EGFR IgA that displays improved pharmacokinetics and myeloid effector cell engagement *in vivo*.** Lohse S\*, Meyer S, Meulenbroek LA, Jansen JH, Nederend M, Kretschmer A, Klausz K, Möglinger U, Derer S, Rösner T, Kellner C, Schewe D, Sondermann P, Tiwari S, Kolarich D, Peipp M, Leusen JH, Valerius T., Cancer Res. 2016 Jan 15;76(2):403-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1232. Epub 2015 Dec 3. PMID:2663492

## 12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit, von der Beratung durch meinen Betreuer abgesehen, sowohl inhaltlich als auch in ihrer Form eigenständig verfasst habe. Weiterhin hat diese Arbeit weder ganz noch in Teilen bereits an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die Arbeit ist weder zur Veröffentlichung eingereicht, noch ist sie bereits in der Vergangenheit veröffentlicht worden. Diese Arbeit ist unter den Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt worden.

Ich habe in der Vergangenheit keine anderen Promotionsversuche unternommen und wähle als Form der mündlichen Prüfung die Disputation. Ich widerspreche der Zulassung von Zuhörern/-innen während der mündlichen Prüfung nicht.

Kiel, den 23. Januar 2018



---

Anna Kretschmer



### **13. Curriculum vitae**

**Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt am 24.08.2020**



## 14. Danksagung

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. Martin Gramatzki, der meine Zeit als Promotionsstudentin als Leiter der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie unterstützt und meine wissenschaftliche Arbeit stets vorangetrieben hat. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Valerius dafür, dass ich meine Arbeit über IgA Antikörper in seiner Gruppe anfertigen durfte. Für seinen Rat in wissenschaftlichen Fragen sowie seiner Hilfe beim Anfertigen von Publikationen und seiner Betreuung bin ich dankbar. Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die hilfreiche Unterstützung in sowohl wissenschaftlichen als auch administrativen Fragen.

I want to thank Dr. Jeanette H.W. Leusen and her group at the UMC Utrecht for their help and assistance with the production of the CD20-IgA antibodies in HEK cells. Their constructive comments on publications, presentations and preliminary data always had an impact on my work and were greatly appreciated.

Herrn Dr. Thies Rösner danke ich für alles. Für den wissenschaftlichen und zwischenmenschlichen Rat. Für seine Hilfe im Labor, mit meiner Dissertation, an Postern/Vorträgen/Talks. Ich danke ihm für sein offenes Ohr in allen Lebenslagen und für seine guten Ideen. Für die Kaffee- und „Raucherpausen“ und Dönerteller. 0,9 für Dich und mehr.

Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp und PD Dr. Christian Kellner danke ich für die konstruktive Kritik und die immerwährend guten Ideen. Außerdem danke ich euch für die vielen Mittagessen, bei denen ich euch mit Problemchen belastet habe und ihr immer freundlich und hilfsbereit geblieben seid. Vielen Dank dafür, dass ihr andere an eurer wissenschaftlichen Erfahrung teilhaben lasst.

Bei Frau Dr. Katja Klausz und Frau Dr. Anna Otte möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft in sowohl wissenschaftlicher als auch privater Hinsicht bedanken. Vielen Dank für das Korrekturlesen von Publikationen und der Hilfe im Labor. Ich bin außerdem dankbar für ausgegebene Kaffees und Kuchen, Knoppers und Tee.

I also want to thank Dr. Elisa Cappuzzello for her friendship and help in any way.

Den technischen Assistentinnen Frau Christyn Wildgrube und Frau Yasmin Claußen danke ich für deren Einsatzbereitschaft, Energie und tatkräftige Unterstützung im Labor. Ohne euch hätte ich so manchen Versuch nicht durchführen können.

Natürlich danke ich auch den anderen technischen Assistentinnen (Britta von Below, Anja Muskulus und Kathinka Tüxen) für ihre Hilfe bei technischen, methodischen und allen anderen Problemen.